Segregierte mathematische Modelle zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und zur Influenza Virus Replikation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. Lars Möhler
geb. am 10.03.1968 in Braunschweig

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Dietrich Flockerzi

Promotionskolloquium am 03.07.2006

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 15

Lars Möhler

Segregierte mathematische Modelle zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und zur Influenza Virus Replikation

Shaker Verlag
Aachen 2006

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2006

Printed in Germany.

ISBN-10: 3-8322-5458-7
ISBN-13: 978-3-8322-5458-2
ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Inhaber des Lehrstuhls Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl für die Überlassung des Themas und für die gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Dietrich Flockerzi danke ich für die Übernahme des Coreferats und vertiefende Diskussionen zum mathematischen Hintergrund der Modellierungsarbeit.

Daneben gilt mein Dank dem Vorsitzenden des Prüfungsausschusses Herrn Jun. Prof. Dr. rer .nat. Ulrich Tallarek.

Frau Dr. rer.nat. Yvonne Genzel danke ich für ihre freundliche und hilfsbereite, aber dennoch kritische Haltung in der Diskussion biologischer Belange.

Meiner mir wichtigsten Kollegin Frau Dipl.-Ing. Dipl.-Biol. Julia Schmidt danke ich für ihre Unterstützung bei diversen Kriseninterventionen sowie für zahlreiche angeregte Diskussionen oder entspannte Zeiten bei Kaffee und Muffins, zusammen mit meinem Kollegen Herrn Dipl.-Ing. Andreas Bock, der mit vielen fachlichen Anregungen ebenfalls einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dipl.-Ing. Ilona Behrendt, Frau Susanne König und Frau Claudia Best für die hervorragende Durchführung der Experimente und die manchmal notwendigen Erläuterungen für einen doch eher theoretisch begabten Wissenschaftler.

Großer Dank gebührt ebenfalls meinen Kollegen am Lehrstuhl und der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik des Max-Planck-Instituts für die Mithilfe sowie die fachlichen Anregungen und zahlreichen Ermunterungen. Ohne Eure Daten, Diskussionen, die fruchtbaren Anregungen und kritischen Anmerkungen würde diese Arbeit nicht entstanden sein!

Herrn Prof. Dr.-Ing. Achim Kienle und Herrn Dipl.-Ing. Martin Haefele danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Simulationen in DIVA, sowie Herrn Dr. Heiner Sann für die Auswertung der Experimente mittels Laser Scanning Mikroskopie.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Herrn Dr. rer. nat. Axel Möhler für seine liebevolle Unterstützung, Motivation und seine Geduld gerade in schwierigen Zeiten.

Abstract

The topic of this thesis was the development of a mathematical model to describe the basic mechanisms of the growth of adherent mammalian cells and the virus dynamics of Influenza A virus in MDCK cells. The segregated cell growth model comprises cells in suspension, cells on microcarriers which are able to proliferate and dead cells. In addition it considers the main substrates, glucose and glutamine, and the inhibitors, lactate and ammonia. The virus replication model takes into account the intracellular delay between the time of infection and the first visibly infected cells. To describe the time course of the upcoming HA titer, the cells are segregated into uninfected and infected cells.

The identification of the parameters for modelling was based on standard cultivations or specific investigations if needed. Parameters which could not be determined experimentally have been taken from literature. Based on these estimations parameters have been optimized to fit the experimental data. An investigation of the sensitivity of the parameters led to the specific maximal growth rate μ_{max}, the maximal possible cell number on microcarriers X_{max}, the attachment rate k_{at}, describing the attachment of the seeded cells to the microcarriers, and the specific death rate k_d as parameters with most influence on maximum cell yield. Concerning the virus replication model the following parameters showed most influence on virus yield: the specific virus replication rate μ_{vir}, the specific death rate of infected cells k_{cdv}, and the concentration of uninfected cells at the time of infection $U_{C,0}$.

1 Einleitung **1**

1.1 Biotechnologische Prozesse 1

1.2 Motivation 2

1.3 Aufgabenstellung und Gliederung 3

1.4 Historische Entwicklung der Zellkultur 6

1.5 Grundlagen des Influenza Virus 11

1.6 Grundlagen der Influenza Impfstoffproduktion 14

2 Modellierung von Bioprozessen **19**

2.1 Grundlagen der mathematischen Modellbildung 19

2.2 Vom Reaktor zum Modell: Bilanzgleichungen beschreiben das System. .. 22

3 Stand der Forschung **27**

3.1 Grundlagen zur Modellierung des Metabolismus 27

3.2 Modelle zur Beschreibung der Virusdynamik 36

4 Material und Methoden **41**

4.1 Zellkultur und Virusreplikation 41

4.2 Verfahren zur Messwerterfassung und statistische Sicherheit 41

4.2.1 Bestimmung der Zellzahl 42

4.2.2 Bestimmung der Metabolite 43

4.2.3 Bestimmung der Viruspartikel 43

4.2.4 Bestimmung der infizierten Zellen auf Carriern 45

4.3 Software 46

5 Wachstum und Stoffwechsel von MDCK Zellen auf Microcarriern **47**

5.1 Ergebnisse 47

5.1.1 Mathematisches Modell 47

5.1.1.1 Shift-Modell (a) 51

5.1.1.2 Logistisches Modell (b) 52

5.1.1.3 Attachment-Modell (c) ... 53
5.1.1.4 Parameterbestimmung für alle Modellvarianten ... 55
5.1.2 Simulationsergebnisse ... 61
5.1.2.1 Shift Modell (a) ... 61
5.1.2.2 Logistisches Modell (b) ... 63
5.1.2.3 Attachment Modell (c) ... 65
5.1.2.4 Parametersensitivitäten ... 74
5.1.2.5 Untersuchung der Abweichung des Systems in den Parametern ... 76
5.2 Diskussion ... 79
5.2.1 Mathematische Modellbildung des Wachstums und Stoffwechsels von adhärenten MDCK Zellen ... 79
5.2.2 Qualität der Parameter und der experimentellen Daten ... 86

6 Replikation von Influenza A Virus in tierischen Zellen ... 93
6.1 Ergebnisse ... 93
6.1.1 Mathematisches Modell ... 93
6.1.1.1 Modellgleichungen ... 96
6.1.1.2 Parameterschätzung ... 98
6.1.2 Simulationsergebnisse ... 99
6.1.3 Parametersensitivitäten ... 103
6.1.4 Abhängigkeit der Virusausbeute von Startzellzahl, MOI und Delay 108
6.2 Diskussion ... 112

7 Zusammenfassung ... 117
8 Ausblick ... 119

Literaturverzeichnis ... 121

Anhang ... 129

Verzeichnis der Abkürzungen

Amn	Ammonium
Asp	Aspartat
α-KG	α-Ketoglutarat
BEI	Binäres Ethylenimin
BHK	Baby Hamster Kidney
°C	Grad Celsius
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EIV	Pferde Influenza Virus (equine influenza virus)
FCS	Fötales Kälber Serum
FS-4	Human Foreskin
FQS	Fehlerquadratsumme
GDH	Glutamin-Dehydrogenase-Weg
Gln	Glutamin
Glc	Glucose
GMEM	Glasgow Minimal Essential Medium
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Stunde (hour)
HA	Haemaglutinin
HIV	Human immunodeficiency virus
i	Zulauf, Zuluft
L	Liter
Lac	Lactat
LSM	Laser Scanning Mikroskop
m	Meter
MC	Microcarrier
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MRC-5	Normal Human Fetal Lung Fibroblast
mL	Milliliter
mM	$mmol \cdot L^{-1}$
MOI	Multiplicity of infection

mRNA	Messenger RNA
NA	Neuraminidase
o	Ablauf, Abluft
O_2	Sauerstoff
ODE	Ordinary differential equation
OTR	Sauerstoffeintragsrate (Oxygen transfer rate)
OUR	Sauerstoffaufnahmerate (Oxygen uptake rate)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pfu	Plaque forming units
RF	Rollerflasche
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
TA	Transaminaseweg
TCA	Zitronensäurezyklus
$TCID_{50}$	Tissue culture infectious dose 50 %
T-Flasche	Zellkulturflasche (Tissue-Flask)
TOI	Time of Infection
V	Volumen
VERO	African Green Monkey Kidney
WHO	World Health Organisation
X	Zellzahl
YSI	Yellow Spring Instruments

Verzeichnis der Symbole

a	Sterberate infizierter Zellen des immunologischen Modells	[h^{-1}]
Amn	Ammoniumkonzentration	[mmol/L]
c_1	glucosespezifischer Sterbekoeffizient	[mmol/L]
c_2	glutaminspezifischer Sterbekoeffizient	[mmol/L]
c_{RBC}	Konzentration der roten Blutkörperchen	[mL^{-1}]
d	Sterberate uninfizierter Zellen des immunologischen Modells	[h^{-1}]
F	Volumenstrom von Zufütterung und Ernte	[L/h]
F	bestimmte Verdünnungsstufe des Virus im HA Test	[log HA/100 µL]
Glc	Glucosekonzentration	[mmol/L]
Gln	Glutaminkonzentration	[mmol/L]
I_C	Anzahl infizierter Zellen	[1/mL]
k	Produktionsrate freier Viruspartikel des immunologischen Modells	[h^{-1}]
k_{at}	Attachmentrate der Zellen	[h^{-1}]
k_{cdf}	Zellsterberate aufgrund Fermentationsbedingungen	[h^{-1}]
k_{cdv}	Zellsterberate aufgrund Virusinfektion	[h^{-1}]
k_d	spez. Sterberate	[h^{-1}]
k_{dQ}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für den Zerfall von Glutamin	[h^{-1}]
k_{det}	Detachmentrate der Zellen	[h^{-1}]
k_{lys}	Lyserate der Zellen	[h^{-1}]
k_{dead}	Sterberate der Zellen	[h^{-1}]
$k_{i,Amn}$	ammoniumspezifischer Sterbekoeffizient	[L/mmol]
$k_{i,Lac}$	lactatspezifischer Sterbekoeffizient	[L/mmol]
k_{va}	Attachmentrate der Viruspartikel	[h^{-1}]
k_{vd}	Sterberate der Viruspartikel	[h^{-1}]
k_{vi}	Infektionsrate	[h^{-1}]
K_{Amn}	Inhibierungskonstante für Ammonium	[mmol/L]
K_{Glc}	Monod-Konstante für Glucose	[mmol/L]
K_{Gln}	Monod-Konstante für Glutamin	[mmol/L]
K_{Lac}	Inhibierungskonstante für Lactat	[mmol/L]
Lac	Lactatkonzentration	[mmol/L]

m_{Glc}	glucosespezifischer Zellerhaltungskoeffizient	[mmol/h]
m_{Gln}	glutaminspezifischer Zellerhaltungskoeffizient	[mmol/h]
n_{Virus}	Anzahl der Viruspartikel	[mL^{-1}]
n	Anzahl experimenteller Daten	[-]
p	Anzahl adaptierbarer Parameter	[-]
p	Vektor der zeitkonstanten Parameter	[…]
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck in Lösungen	[$\%_{Luftsättigung}$]
r_{gen}	Bildungsrate	[$L^{-1}\cdot h^{-1}$]
r_{cons}	Verbrauchsrate	[$L^{-1}\cdot h^{-1}$]
R_0	Wurfgröße (Basic Reproductive Ratio)	[-]
S	Substratkonzentration	[mmol/L]
s_r	Reststandardabweichung der Simulation bezüglich experimentellen Daten, normiert	[-]
t	Zeit	[h]
T	Temperatur	[°C]
u	Sterberate freier Viruspartikel des immunologischen Modells	[h^{-1}]
u	Vektor der zeitveränderlichen Eingangsgrößen	[…]
U_C	Anzahl uninfizierter Zellen	[1/mL]
V	Reaktionsvolumen	[L]
V	Anzahl Viruspartikel	[1/mL]
w	lokale Sensitivität	[-]
w	Gewichtungsmatrix	[…]
x, X	Vektor der differentiellen Zustandsgrößen	[…]
X_d	Anzahl toter Zellen	[1/mL]
X_{max}	Maximale Zellzahl auf einem Microcarrier	[1/mL]
X_{MC}	Anzahl lebender Zellen auf Microcarriern	[1/mL]
X_{Sus}	Anzahl lebender Zellen in Suspension	[1/mL]
X_V	Anzahl lebender Zellen	[1/mL]
y	Vektor der algebraischen Zustandsgrößen	[…]
$Y_{X,Glc}$	glucosespezifischer Ausbeutekoeffizient	[1/mmol]
$Y_{X,Gln}$	glutaminspezifischer Ausbeutekoeffizient	[1/mmol]
Z	Anzahl von Erythrozyten	[mL^{-1}]

Verzeichnis griechischer Formelzeichen

α_{Amn}	zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Ammonium	[mmol]
α_{Lac}	zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Lactat	[mmol]
β	Infektionsrate des immunologischen Modells	[h^{-1}]
δ	partielle Ableitung	[-]
Δ	Differenz	[…]
λ	Produktionsrate uninfizierter Zellen Zellen des immunologischen Modells	[h^{-1}]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h^{-1}]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h^{-1}]
μ_{vir}	Virusreplikationsrate	[h^{-1}]
$\sigma(S)$	substratabhängige Sättigungsfunktion	[-]
τ	Shift, Zeitverzögerung	[h]

1 Einleitung

1.1 Biotechnologische Prozesse

Die Einsatzgebiete der Biotechnologie reichen von Verfahren zur biologischen Abwasserbehandlung bis hin zur Produktion hochspezifischer Medikamente. Im Gegensatz zu verschiedenen Produktionswegen der klassischen Chemie bedient sich die Biotechnologie umweltschonender und ressourcenorientierter Verfahren, die vielmals erst die Herstellung komplexer Stoffe ermöglichen. Hierfür sind verschiedene Produktionsverfahren der Pharmaindustrie, wie z.B. Steroide in *Mycobacterium*, Penicilline in *Penicillium notatum* oder *Penicillium chrysogenum* oder monoklonale Antikörper in Hybridomazellen zu nennen. Häufig werden Pharmaka in Bioreaktoren produziert. Dabei werden Mikroorganismen oder eukaryotischen Zellen kultiviert, die spezifisch für das jeweilige Produkt sind. Durch gentechnische Manipulation können diese Stämme – Bakterien oder Pilze – oder Zelllinien das Vielfache an Produkt liefern als die Wildstämme. Außerdem können Organismen oder Zellen genetisch modifiziert werden, um den gewünschten Stoff herzustellen (z.B. Interferon, Ershov et al., 1976 bzw. Insulin, Vernet et al., 1985). Während meist Primär- oder Sekundärmetabolite des verwendeten Organismus die gewünschten Stoffe sind, ist z.B. bei der Produktion von Bäckerhefe die Hefekultur selbst das Produkt. Als Primärmetabolite werden Stoffe bezeichnet, die während der Wachstumsphase gebildet werden, in der alle notwendigen Metabolite ausreichend vorhanden sind (balanciertes Wachstum, Tropophase; Meiners, 1990). Sekundärmetabolite entstehen demgegenüber, wenn aufgrund der Kultivierungsbedingungen, z.B. Substratmangel, der Stoffwechsel der Zellen umgestellt wird (unbalanziertes Wachstum, Idiophase). Weiterhin können durch virale Infektion der Wirtszellen entstehende Viruspartikel das gewünschte Produkt sein. Eine gute Übersicht über biopharmazeutische Produkte und die Entwicklung ihrer Herstellungsprozesse in den letzten 20 Jahren findet sich in Birch & Onakunle (2005).

1.2 Motivation

Influenza Viren sind weltweit verbreitet. Sie führen jedes Jahr im Winter zu sporadischen Erkrankungen, lokalen Ausbrüchen oder Grippeepidemien, die sich in ihrer Intensität und Schwere unterscheiden. In der nördlichen Hemisphäre tritt die Grippe meist zwischen November und April, in der südlichen Hemisphäre zwischen Mai und September auf. Die Auswirkungen einer Grippewelle – und damit ist nicht ein alljährlicher Infekt mit grippeähnlichen Symptomen gemeint – können je nach Aggressivität des Erregers für Mensch und Tier verheerend sein. Das Grippevirus ist hoch ansteckend und kann für alte und schwache Menschen eine tödliche Folge haben. Seine schnelle Ausbreitung ist nicht nur durch die Übertragbarkeit über Zugvögel sondern auch das heutige Reiseverhalten gegeben. Neben der Etablierung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen, z.B. Importverbot und Quarantäne von vermutlich infizierten Tieren kann die Ausbreitung einer Epidemie durch Impfschutz für Menschen und wertvoller Tierbestände eingedämmt werden. Mit Influenza Viren können Menschen, Schweine, Pferde infiziert werden. Die Erreger verursachen eine Erkrankung der oberen Atemwege. Vögel, bei denen in der Regel eine Infektion des Darmtraktes erfolgt, sind Überträger und Produzenten neuer Virussubtypen. Durch die schnelle Veränderung des Influenza Virus (Kapitel 1.5) und die potentielle Ansteckung mit einem neuen Virusstamm muss die Schutzimpfung beim Menschen jährlich aktualisiert werden. Die geringe Zeit, die zwischen der Empfehlung der WHO über die potentiellen Subtypen zur kommenden Wintersaison bis zur Produktion des Impfstoffs zur Verfügung steht, und die Notwendigkeit der Impfung eines Großteils der gefährdeten Population, macht die schnelle Herstellung großer Mengen an Impfstoff zur wirksamen Unterdrückung einer Pandemie erforderlich. Es wurde gezeigt, dass für die Produktion von Influenza A Virus der Einsatz von hocheffektiven Produktionsstrategien in tierischern Zellkultur möglich ist (Merten et al., 1999), die Vorteile gegenüber der derzeitigen Produktion in Hühnereiern gibt (Tree et al., 2001).

1.3 Aufgabenstellung und Gliederung

Mathematische Modelle zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und zur Influenza Virus Replikation in Microcarrierkultur

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die mathematische Modellierung eines Prozesses zur Impfstoffherstellung von Influenza A Virus. Dieser Prozess dient in der Forschungsgruppe Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg als experimentelles Modellsystem. Das zu erstellende Modell soll zur Optimierung des Prozesses beitragen, indem es das Verständnis der Systemzusammenhänge erweitert und Grundlagen für neue Regelungs- und Prozessführungsstrategien legt. Das Influenza A Virus wird in einem zweistufigen Prozess in einem Microcarriersystem hergestellt. Im ersten Prozessschritt werden adhärente tierische Zellen (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK) im Bioreaktor auf Microcarriern bis zum vollständigen Bewuchs der Oberfläche (Konfluenz) kultiviert. Damit ist die als Wirt zur Virusreplikation zur Verfügung stehende Zellzahl begrenzt. Der zweite Prozessschritt, die Produktion der Viruspartikel, schließt sich nach einem Waschvorgang und der Zugabe von frischem Medium und Saatvirus an. Die mathematische Modellierung des ersten Prozessteils soll unter Berücksichtigung der grundlegenden Stoffwechselwege des Metabolismus das Wachstum von adhärenten Zellen auf Microcarriern abbilden. Ein entsprechender Ansatz ist in der bekannten Literatur nicht zu finden. In dieser Arbeit wird hierzu ein segregiertes Modell vorgestellt, das die wichtigsten Stoffwechselwege berücksichtigt. Es ermöglicht eine Bestimmung der einflussreichsten Parameter auf die Zellausbeute und soll als Basis zur weiteren experimentellen Planung und zu Prozessverbesserungen in der Arbeitsgruppe dienen können.

Das mathematische Modell des zweiten Prozessteils soll eine grundlegende Betrachtungsweise des Vorgangs der Virusreplikation von Influenza A Virus ermöglichen. Das hierzu erstellte unstrukturierte, segregierte Modell bietet die

Möglichkeit der Bestimmung der Parameter, die den Haupteinfluss auf die Virusausbeute, und damit eine Möglichkeit zur Verbesserung der Prozessproduktivität haben. Die Teilung des Prozesses in zwei Schritte begründet die Struktur der vorliegenden Arbeit. Im ersten Kapitel werden in zwei Unterkapiteln die Entwicklung der Zellkultur, die Grundlagen des Influenza Virus und der Impfstoffproduktion behandelt. Mit der Einführung in die mathematische Modellierung von Bioprozessen befasst sich Kapitel 2. In Kapitel 3 werden Arbeiten zur Modellierung – in getrennten Unterkapiteln – des Zellwachstums und der Virusreplikation präsentiert und somit ein Überblick zum derzeitigen Forschungsstand gegeben. Kapitel 4 stellt Material und Methoden vor, die für die experimentellen Bezüge der vorliegenden Arbeit relevant sind.

In Kapitel 5 wird das segregierte Zellwachstumsmodell erläutert. Dieses Kapitel umfasst die Darstellung der Modellgleichungen, die Simulationsergebnisse und die Diskussion des Modells zum ersten Prozessschritt: Unter Berücksichtigung der Stöchiometrie des betrachteten metabolischen Netzwerkes wird das bekannte biologische Wissen über die Zusammenhänge des Stoffwechsels tierischer Zellen mathematisch abgebildet. Der erste Modellteil gibt das Wachstum der adhärenten Zellen unter Verbrauch von Substraten, Glucose und Glutamin, und Produktion von Inhibitoren, Lactat und Ammonium, wieder. Zunächst wird auf die Herleitung der Modellgleichungen des Batch Prozesses für die Vermehrung adhärenter Zellen (MDCK) eingegangen. Hierzu werden drei unterschiedliche Ansätze präsentiert, um die für das Wachstum auf Microcarriern typische Verzögerungszeit zwischen Einsaat der Zellen und beginnenden Wachstums (Lagphase) abzubilden und die experimentellen Daten durch eine Simulation zu beschreiben. Dazu entwickelt werden a) ein Shift Modell: Ein Shift des experimentellen Datensatzes, b) ein logistisches Modell: Einführung eines logistischen Terms und c) ein Attachment Modell: Segregierung der Zellpopulation in lebende Zellen in Suspension, lebende Zellen auf Microcarriern und tote Zellen. Die Modellgleichungen der drei betrachteten Modellvarianten werden erörtert und es wird auf die Bestimmung der jeweils

zugehörigen Parameter eingegangen. Unter Berücksichtigung der experimentellen Anfangsbedingungen werden Simulationsergebnisse dargestellt und im Vergleich mit den experimentellen Werten diskutiert. In diesem Zusammenhang wird auf die Sensitivitätsanalyse der Parameter für das Attachment Modell eingegangen.

Kapitel 6 behandelt das grundlegende Infektionsmodell, das die Prinzipien der Virusreplikation im Bioreaktor darlegt. Dieses Kapitel umfasst ebenfalls die Darstellung der Modellgleichungen und der Simulationsergebnisse und eine anschließende Diskussion des Modells zum zweiten Prozessschritt. Inhalt dieses Kapitels ist die Untersuchung der grundlegenden Prozessabläufe, die die Virusreplikation in tierischer Zellkultur bestimmen und begrenzen. Dieses Vorgehen kann zu einem besseren Verständnis der Virus-Zell Interaktion und zur Kenntnis der Parameter, die einen Haupteinfluss auf die Virusausbeute haben, führen. Es werden die Modellgleichungen für ein Shift Modell (Zeitverschiebung des experimentellen Datensatzes) und ein Delay Modell (Zeitverzögerungsterm innerhalb der Differenzialgleichung, delay differential equation) vorgestellt, die die Verzögerung zwischen Infektion und der beginnenden Replikation der Viruspartikel berücksichtigen. Die Herleitung der Anfangsbedingungen und Parameter werden erklärt. Anschließend werden die Simulationsergebnisse präsentiert und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Es folgt eine Sensitivitätsanalyse der Parameter für beide Modellvarianten. Alle Datensätze sind unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen gewonnen worden. Mit Hilfe des Modells werden die relevanten Parameter bestimmt, die den größten Einfluss auf die erzielte Virusausbeute nehmen. Zusammen mit dem Modell zum Zellwachstum kann diese Modellierung helfen, einen Weg zur Optimierung der Produktion von Influenzavakzinen zu finden. Kapitel 7 beinhaltet eine Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit.

1.4 Historische Entwicklung der Zellkultur

Die Entwicklung der Zellkultur hat ihre Wurzeln im 19. Jahrhundert und entstand aus der Erforschung, wie sich Gewebe- und organische Zellen außerhalb des Körpers vermehren, was sie zum Wachstum benötigen und von welchen Einflüssen der Zellzyklus abhängt (Morgan et al., 1994). Harrison (1907) gelang erstmals die Züchtung von Froschgewebezellen in Lymphe. Carrel (1912) befasste sich mit der Etablierung weiterer Säugerzellkulturen. Die Methoden in der Zellkultur entwickelten sich anfangs des 20. Jahrhunderts von empirischen Verfahren zu einer modernen quantitativen Wissenschaft (Vriezen et al., 2001). Die Entdeckung von Enders (1949), dass humanopathogene Viren in Zellkultur vermehrbar sind (verschiedene Gewebekulturen menschlicher Embryozellen), kann als Startpunkt der Zellkultur in ihrer heutigen Form angesehen werden (Griffith, 2000). Sechs Jahre später gelang die erste große industrielle Anwendung mit der Salk Polio-Impfstoffproduktion in Zellkultur von Affennieren (Neva & Salk, 1955). Weitere Zelllinien wurden aus Säugetieren, z.B. diverse Organzellen von Menschen, Hunden und Mäusen (Enders et al., 1949; Werner, 1993), aber auch von Insekten und Reptilien, bzw. Fischen etabliert (Petersen, 1977; Clark & Kritchevsky, 1972; Kuhn et al., 1979). Eine Klassifizierung lässt sich in Primärzellen (Herkunft direkt aus Geweben oder Organen, mit nur geringer oder keiner weiteren Möglichkeit der Zellteilung), und kontinuierliche Zelllinien (immortalisierte, permanente Zellen, mit sehr hoher Lebensdauer, die über Jahre hinweg durch Passagieren vermehrt werden können) vornehmen. Zelllinien können aus Primärkulturen gewonnen werden, indem man Zellen selektiert, die ein mehrmaliges Passagieren überleben. Diese Zellen haben ihre Fähigkeit sich zu teilen erhalten. Als Passage wird die enzymatische Ablösung von Zellen aus bestehenden Kulturen vom Untergrund und das anschließende erneute Ausplattieren bezeichnet. Meist können Zellen nur über eine begrenzte Anzahl von Passagen kultiviert werden. Dann sterben sie ab oder verlieren eine Reihe ihrer Eigenschaften. Einige Zellen vollziehen jedoch aufgrund ihrer genetischen Variabilität eine

selbstständige Umwandlung in eine kontinuierliche Zelllinie. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. Zellen, die aus Tumoren stammen, entwickeln sich fast immer zu kontinuierlichen Zelllinien. Als Hybridoma werden Zellen bezeichnet, die durch Fusion von Lymphozyten und Myelomazellen (Köhler et al., 1975, 2005) erhalten wurden.

Weiterhin werden tierische Zelllinien in adhärente, d.h. nur auf Oberflächen wachsende und nichtadhärente, frei in Suspension vermehrbare Zellen eingeteilt. Fast alle Zellen, die sich in Suspensionskulturen vermehren lassen, stammen von Zellen des Immunsystems oder deren Vorläufern ab (z.B. humane leukämische Lymphozyten, Collins et al., 1977; Burkitt-Lymphom, Klein et al., 1968). Adhärente Zelllinien kommen hingegen von bestimmten Geweben oder Organen, also Zellen, die sich *in vivo* im Verband befinden und eine Oberfläche zum Wachstum und zur Zellteilung benötigen und zeigen meist eine dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Durch Änderung der Kultivierungsbedingungen ist es gelungen, ehemals adhärente Zelllinien ebenfalls in Suspension zu vermehren. In Zellkultur verhalten sich tierische Zellen wie einzellige Organismen, d.h. sie wachsen und vermehren sich, solange alle notwendigen Nährstoffe in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und keine Einschränkungen in der Wachstumsumgebung existieren.

Als Beispiele für Suspensionszellen in der industriellen Produktion seien Hybridoma, Chinese Hamster Ovary (CHO) und Baby Hamster Kidney (BHK), für adhärente Zellen African Green Monkey Kidney Cells (Vero), CHO-K1 und Madine Darby Canine Kidney (MDCK) genannt. Die Anwendung von Hybridomazellen ist die Produktion rekombinanter Antikörper, das Anwendungsgebiet für CHO Zellen sind neben Antikörpern auch rekombinante Proteine, für BHK, Vero und MDCK Zellen die Impfstoffproduktion (Maul- und Klauenseuche, Polio bzw. Influenza). Eine Übersicht über Produkte von tierischen Zellkulturen ist in Griffith (2000) zu finden. Vorteilhaft ist die Kultivierung von Suspensionszellen insofern, als sich eine Vergrößerung des Produktionsvolu-

mens (Scale-Up) und eine kontinuierliche Kulturführung realisieren lässt. Ist die Kultivierung in Suspension nicht möglich, müssen statische Systeme wie Rollerflaschen und Stapelwannen zum Einsatz kommen. Soll ein Wave®- oder Rührkesselreaktor verwendet werden, wird die zum Zellwachstum benötigte Oberfläche durch Microcarrier (van Wezel, 1967, Giard et al., 1977, Levine et al., 1977) zur Verfügung gestellt: Kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 100 bis 300 µm, z.B. aus Dextran, werden dem Medium zugeführt und bieten den Zellen die zur Vermehrung nötige Oberfläche. Sie haben eine nur geringfügig höhere Dichte als das Kulturmedium und können durch Rühren gut suspendiert werden. Gegenüber Rollerflaschen bietet der Rührkesselreaktor nicht nur weniger Arbeitsaufwand, sondern insbesondere die Möglichkeit der Regelung des Prozesses. Gegenüber Suspensionskulturen sind keine kontinuierlichen Prozesse möglich, sondern nur die Betriebsbedingungen Satz (Batch) und Nachfütterung (Fed-Batch, Meiners, 1990). Diese Fütterungsstrategien ermöglichen das Zellwachstum entweder unter sofortiger Zugabe aller notwendigen Substrate und Aminosäuren oder unter Nachfütterung. Eine Perfusion erlaubt die Zugabe neuen Substrats unter gleichzeitiger Abfuhr entstandener Metabolite, wobei die Zellen im Bioreaktor zurückgehalten werden (Smith, 1994). Eine detaillierte Einführung in die Prinzipien der Zellkulturtechnik ist in Freshney (2000), Griffith (1999), Clynes (1998), Morgan (1994), Smith (1994) und Arathoon et al. (1986) zu finden.

Seit geraumer Zeit beschäftigt sich die Forschung damit, die Zellkulturprozesse zu optimieren, d.h. die Ausbeuten und/oder die Reproduzierbarkeit des Prozesses zu verbessern. Strategien reichen von der Reduzierung von Beiprodukten, die das Zellwachstum behindern, wie Lactat und Ammonium (Glacken, 1986) bis zum Bestreben, Wachstumslimitierungen aufgrund eines zu geringen Gasaustauschs zu verringern, ohne gleichzeitig die Scherkräfte durch eine erhöhte Rührerdrehzahl zu vergrößern (Bailey et al., 1986). Weiterhin muss das Wachstumsmedium die Zellen immer mit einer ausreichenden Konzentration an Nährstoffen, als die wichtigsten Glucose und Glutamin, weiterhin anderen Aminosäuren und Serum, versorgen. Statt der einmaligen oder während der Kulturzeit undifferenzierten Zugabe aller notwendigen Stoffe kann an dieser Stelle eine Prozessregelung das Wachstum verbessern (Meiners, 1990). Die Kultur tierischer Suspensionszellen zur Produktion monoklonaler Antikörper ist inzwischen zu einem Punkt der Optimierung gelangt, in dem neben dem Design eines optimal durchmischten Reaktors mit Zellrückhaltung eine Regelung der Zufütterung mit einem genetischen Algorithmus erfolgt (Lavric, 2006). Derartige Arbeiten stehen für adhärente Kulturen noch aus.

Um das Verständnis des Zellwachstums verbessern zu können, sind mathematische Modelle eine sehr gute Hilfestellung. Die Zellen werden in einer komplexen Wachstumsumgebung kultiviert, viele Stoffe im Wachstumsmedium sind noch nicht eingehend erforscht. Die Modellbildung kann bei der Überprüfung helfen, ob Stoffwechselwege verstanden und richtig abgebildet wurden. Die nötige Voraussetzung der Bestimmung von Verbrauchs- oder Produktbildungsraten – die Bestimmung der Zellzahl – ist stark fehlerbehaftet und führt zu einer Falscheinschätzung der Raten (Meiners, 1990). Ein Modell kann als Zustandsschätzer für z.B. schwierig zu bestimmende Größen wie Zellzahlen oder nur nicht on-line erfassbare Metabolite genutzt werden, um Raten exakt zu bestimmen oder eine Zufütterungsstrategie zu entwickeln. Durch den Vergleich des Modells mit experimentellen Daten können Parameter geschätzt

werden, deren Auswirkungen auf das System getestet werden können, ohne eine Reihe von Experimenten durchführen zu müssen (Munack et al., 1986). Fortschritte in diesem Bereich werden zur Herausforderung, dadurch dass sich Zustandsgrößen, wie z.B. eingangs genannt die Zellzahl, nur ungenau bestimmen lassen und auch die Stoffwechselwege ein Zusammenspiel bilden, das noch nicht in allen Einzelheiten bekannt und verstanden ist. Weiterhin sind einige Prozessparameter, wie z.B. Produktbildungs- oder Ausbeuteraten für den Kultivierungszeitraum nicht konstant (Fu et al., 1994) und die Komposition des Wachstumsmediums ist derart komplex, dass eine Auswahl der relevanten Stoffwechselwege tierischer Zellen und deren genaue Beschreibung erschwert wird (Glacken et al., 1998).

1.5 Grundlagen des Influenza Virus

Influenza ist eine infektiöse und hoch ansteckende Krankheit der oberen Atemwege (Nicholson et al., 1998; Flint et al., 2000; Lipatov et al., 2004). Die Infektion mit Influenza Virus geschieht per Tröpfcheninfektion d.h. direktes Einatmen von Expirationströpfchen (Ausatmungströpfchen) infizierter Personen, oder über Kontaktinfektion bzw. Schmierinfektion (Kot) mit den Viren der auf Gegenständen oder Körperoberflächen niedergegangenen hoch infektiösen Expirationströpfchen, wenn sie anschließend über die Schleimhäute z.B. in Mund, Nase oder Augen in den Körper gelangen. Weiterhin ist eine Infektion über das Trinkwasser, unter Umständen sogar über das öffentliche Trinkwassernetz, da die Viren bei Kälte über mehrere Wochen konserviert werden und so in der kalten Jahreszeit bis zum Wasserhahn gelangen können, möglich. Das Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae und ist ein Negativstrang RNA Virus, das in der Regel rund ist und einen Durchmesser von 80 bis 120 nm hat. Die Virushülle setzt sich zusammen aus der Lipidmembran der Wirtszelle, in die die virusspezifischen Proteine, das Haemagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und das M2 Protein, eingefügt sind. Dabei sind zwei dieser Oberflächenproteine von bekannter Bedeutung: Das HA, das für das Andocken und die Fusion des Virus mit der Zelle verantwortlich ist, und die NA, die Sialinsäurereste von den Glycoproteinen der Zelloberflächen und den Viren abspaltet und die Freisetzung von Tochterviren aus den infizierten Zellen ermöglicht. Die Influenza A Viren werden nach bestimmten, deutlich unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in Untertypen bzw. Subtypen eingeteilt. Dies geschieht nach dem Muster A/HxNx oder A/Land/HxNx/Probe. Bisher wurden insgesamt 16 HA-Untertypen und 9 NA-Untertypen erkannt.

Im Wesentlichen gibt es drei Gattungen dieses Virus:

1. Influenza A Viren:

Die lineare, einzelsträngige RNA ihres Genoms besitzt 8 Segmente, und sie zeichnen sich besonders durch große Unterschiede in den antigenen Eigenschaften aus, die im Vergleich zu den anderen Gattungen auf besonders hoher Mutationsfrequenz und Neugruppierungen beruhen. Diese Untertypen befallen üblicherweise jeweils nur einen bestimmten Wirt. Dazu zählen der Mensch und verschiedene Säugetierarten wie Schwein, Pferd (vgl. Pferdegrippe), Nerz, Seehund und Wal sowie zahlreiche Vogelarten. Das primäre Reservoir aller Influenza A Viren liegt im Wassergeflügel.

2. Influenza B Viren:

Ihr Genom hat ebenfalls eine 8-fach segmentierte lineare, einzelsträngige RNA und sie befallen nur Menschen.

3. Influenza C Viren:

Im Gegensatz zu den Influenza A und B Viren hat die lineare, einzelsträngige RNA des Genoms der Influenza C Viren nur 7 Segmente und sie besitzen keine Neuraminidase (NA). Außerdem liegt bei diesen Viren ein Glykoprotein vor, das sowohl die Aufgaben der Rezeptorbindung des Virus an die Wirtszelle, der anschließenden Eindringung (Fusion) wie auch der späteren Freisetzung der neu gebildeten Viren aus der Zelle übernimmt. Das Influenza C Virus befällt Mensch und Schwein, doch spielt es bei Erkrankungen des Menschen keine relevante Rolle, da es, wenn überhaupt, nur zu milden Erkrankungen führt.

Durch das Fehlen eines Korrekturmechanismus beim RNA Virus ist, im Gegensatz zur DNA-Fehlerkorrektur (proof-reading), eine erhebliche Steigerung der genetischen Veränderlichkeit (Variabilität) der Influenzaviren über eine hohe Mutationsfrequenz möglich. Ebenfalls hat das Virus die Fähigkeit zur

genetischen Neuzusammenstellung (Reassortment). Dazu muss ein Organismus gleichzeitig von zwei Virusvarianten infiziert werden (Doppelinfektion), was zu einer Neuzusammenstellung unter den zweimal 8 Genomsegmenten der beteiligen Influenzaviren führen kann, indem einzelne oder mehrere RNA-Moleküle zwischen den Influenzaviren in einer doppelt infizierten Zelle ausgetauscht werden. Diesen Vorgang kann im Menschen, aber auch in anderen Wirten, beispielsweise Vögeln und Schweinen, erfolgen. Die so verursachten größeren Veränderungen (Antigenshift) in den viralen Oberflächenantigenen werden allein bei den Influenza A Viren beobachtet. Derartige Veränderungen können der Ursprung von Pandemien sein, von denen es im 20. Jahrhundert die von 1918/19 mit dem Subtyp H1N1, die von 1957 mit H2N2, die von 1968 mit H3N2 und die von 1977 mit dem Wiederauftauchen von H1N1 gab. Eine Häufung von Punktmutationen in den Nukleotiden der beiden Glykoproteine HA und NA führt zu einer Antigendrift. Dies führt zu einer Änderung der Oberflächenantigene des Grippevirus. Menschliche Antikörper sind nach einer Immunisierung immer nur für ein bestimmtes Oberflächenantigen spezifisch. Diese eher kleinen Veränderungen sind der Grund dafür, dass ein Mensch mehrmals in seinem Leben mit einer anderen nur geringfügig veränderten Virusvariante (Driftvariante) infiziert werden kann und dass Epidemien und regional begrenzte Ausbrüche regelmäßig wiederkehren. Der Antigendrift macht außerdem eine jährliche Erneuerung des Impfschutzes notwendig.

Der Impfschutz geschieht in der Regel mit inaktivierten Viruspartikeln (Totimpfstoff), die eine Produktion von Antikörpern gegen die Oberflächenproteine, vornehmlich das HA, des Virus induzieren. Er bewirkt einen Impfschutz von etwa 6 bis 12 Monaten. Antikörper gegen die NA sind hingegen weniger effektiv (Roitt et al., 1989, Govorkova et al., 2004). Antikörper gegen die internen Viruskomponenten (Proteine oder RNA) werden als mehr oder weniger ineffizient betrachtet. Lebendimpfstoffe wirken effizienter als Totimpfstoffe, da sie neben humoraler Immunität (eine durch in den Körperflüssigkeiten zirkulierende Antikörper bewirkte Form der Immunität) auch zelluläre Immunantworten

auszulösen. Eine Immunantwort auf das HA allein hat eine geringere Wirksamkeit zur Folge. Lebendimpfstoffe finden im europäischen Raum weniger Anwendung.

Der saisonale Impfschutz erfolgt beim Menschen derzeit mit drei Subtypen des inaktivierten Influenza Virus, die im Februar des jeweiligen Jahres von der WHO als die wahrscheinlichsten für die folgende Grippewelle in der betreffenden Region angekündigt werden. Diese werden als Saatviren an die Impfstoffhersteller gesendet. Der Hersteller führt, um optimale Ausbeuten zu erhalten, eine Reassortierung (High-Growth Reassortment) durch, die ungefähr sechs Wochen dauert.

1.6 Grundlagen der Influenza Impfstoffproduktion

Produktion von Influenza Vakzinen in Hühnereiern

Ausgangsmaterial für die Herstellung eines inaktivierten Virusimpfstoffes sind Viruspartikel, die in großer Anzahl hergestellt werden müssen. Zur Replikation des Virus wird ein Wirt benötigt. Derzeit werden inaktivierte Impfstoffe gegen humanpathogenes Influenza A Virus hauptsächlich in Hühnereiern hergestellt. Die Produktion des Influenza Impfstoffes in Eiern ist jedoch arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Die Produktion des Impfstoffes dauert ca. 6 Monate, der fertige Impfstoff liegt im Juni/Juli vor und wird jährlichen klinischen Studien unterzogen. Im Fall einer Influenza-Pandemie ist die großtechnische Produktion in Eiern durch den Bedarf an Millionen von Eiern nicht zu realisieren. Zudem erfordern Ei-Impfstoffe eine komplizierte Aufreinigung und verursachen Nebenwirkungen, bei denen Allergien gegen Proteine der Eier ein besonderes Problem darstellen. Ein weiterer Nachteil ist die Anfälligkeit des Produktionsprozesses für Kontaminationen und der deshalb nötige Einsatz großer Mengen Antibiotika. Pandemische Influenza Stämme sind zudem sehr aggressiv. Ein großes Potential der Ausbeutesteigerung ist lediglich bei der Impfstoffpro-

duktion in tierischer Zellkultur zu sehen (Palache et al., 1999). Die Kultur tierischer Zellen bietet die Möglichkeit einer Vergrößerung der Arbeitsvolumina und Zeitvorteile, da eine Adaption des Saatvirus an das Zellsystem weniger aufwändig ist.

Produktion von Influenza Vakzinen in Zellkultur

Seit einigen Jahren sind deutliche Fortschritte in der Herstellung von Impfstoffen in tierischer Zellkultur (Baculovirus in Insektenzellen (Maranga, 2002; Nielsen, 2000; Dee et al., 1997b) zu verzeichnen. Auch in der Produktion humaner oder veterinärer Influenza Impfstoffe wurden Fortschritte sowohl in der Zellkultur (MDCK Zellen: Robertson et al., 1995; Reichl, 2000; Pau et al., 2001; Vero Zellen: Kistner et al., 1998; Govorkova et al., 1999; Merten et al., 1999) als auch in der Aufreinigung (Nayak et al., 2005; Morenweiser et al., 2005) erreicht.

Prozess der Influenza Virus Herstellung am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik

Für die Arbeiten am Lehrstuhl wurde als experimentelles Modellsystem die Replikation von Pferdeinfluenza A Virus (equine influenza virus, EIV) ausgewählt. Dieser Subtyp ist repräsentativ für die derzeit verwendeten Stämme zur Produktion von inaktiviertem Impfstoff für Pferde (A/Equi 2 (H3N8), Newmarket 1/93) und nicht humanpathogen. Die Viren werden in der Forschungsgruppe des Lehrstuhls in Anlehnung an industrielle Produktionsprozesse in einem zweistufigen Prozess mit Microcarriersystem hergestellt (Abbildung 1).

Im ersten Schritt werden die adhärenten MDCK-Zellen aus der Rollerflaschenvorkultur in gerührten Bioreaktoren vermehrt. Die eingesäten Zellen müssen zunächst am Microcarrier anheften und zur Zellteilung abflachen. Durch das Anheften der Zellen an die Microcarrier und die Abflachung der Zellen bis zur beginnenden Vermehrung entsteht eine Verzögerungszeit (Lagphase, Ruaan et al., 1993). Es kann eine unterschiedliche Anzahl von Zellen pro Microcarrier

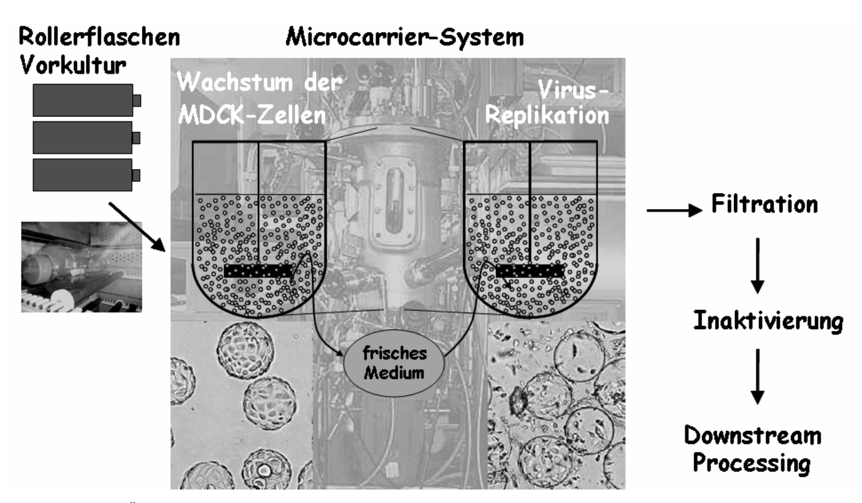

Abbildung 1: Übersichtsschema der Virusherstellung am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik: Vorkultur; zweistufiger Prozess der Kultur adhärenter tierischer Zellen und anschließender Virusreplikation; Aufarbeitung.

andocken. Der Zellverband, oder die einzelnen Zellverbände im Falle mehrerer Zellanheftungen an einem Carrier, wächst an seiner äußeren Grenze und dehnt sich über den Carrier aus, bis ein gleichmäßiger Zellrasen entstanden ist. Es wächst nur eine Zellschicht auf dem Microcarrier. Das Zellwachstum findet deshalb nicht deutlich exponentiell ausgeprägt statt (Lindner et al., 1987): Durch die begrenzt auf den Microcarriern zur Verfügung stehende Oberfläche werden die Zellen schnell kontaktinhibiert, ein Hauptunterschied zu Zellen, die sich in Suspension vermehren. Etwa 90 % aller Microcarrier werden innerhalb von 4 bis 5 Tagen konfluent bewachsen. Anschließend wird das verbrauchte Kulturmedium ausgewechselt und die Zellen mit Virus unter Zugabe von Trypsin, was das Eindringen des Virus in die Zelle erleichtert (Lindner et al., 1987), infiziert. Innerhalb 2 bis 3 weiterer Tage findet die Virusreplikation statt. Eine erfolgreiche Infektion der Zellen zeigt sich am Ablösen der Zellen vom Microcarrier und anschließender Lyse, erkennbar am Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks (Genzel et al. 2004). Im anschließenden Aufreinigungsprozess werden zunächst alle größeren Partikel mittels Tiefenfilter

abgetrennt. Nach der Inaktivierung mit binärem Ethylenimin (BEI) werden die Viruspartikel bzw. deren Bruchstücke im Downstream-Processing aufgereinigt (Nayak et al., 2005).

Ein repräsentatives Profil für Temperatur, Sauerstoffpartialdruck (p_{O_2}) und pH-Wert für beide Prozessteile zeigt Abbildung 2. Das Profil der p_{O_2}-Kurve ist durch die Zutaktung reinen Sauerstoffs bei Erreichen des als minimalen gewählten Sauerstoffpartialdrucks von 40 $\%_{Luftsättigung}$ bedingt. Die Frequenz gibt Aufschluss über die Atmungsaktivität der Zellen. Der nach Einsaat der Zellen zunächst nur geringe Sauerstoffverbrauch (bis zum Zeitpunkt 24 h) macht die Lagphase bis zum Einsetzen des Wachstums deutlich. Danach zeigt sich das Einsetzen des Zellwachstums (24 bis 92 h) durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch. Die Zunahme der Zellzahl macht sich durch eine Steigerung der Frequenz bemerkbar. Temperatur und pH-Wert werden während des gesamten Prozesslaufes auf konstante Werte geregelt.

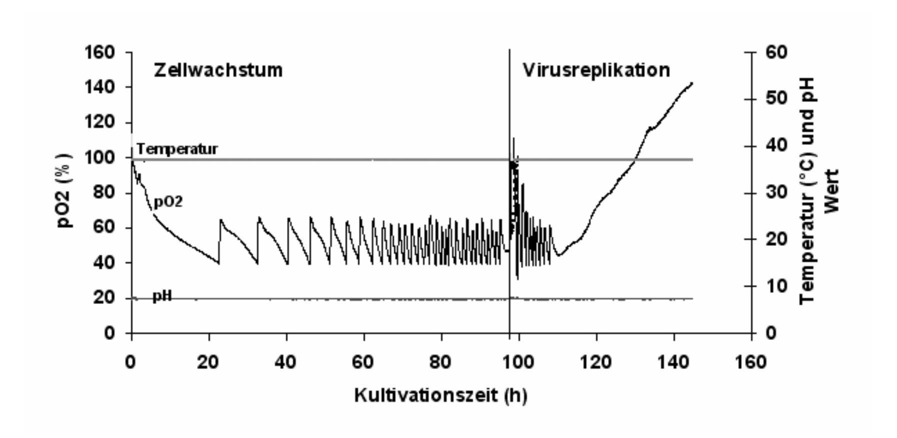

Abbildung 2: On-line Daten einer typischen MDCK-Kultivierung im Bioreaktor. Temperatur T = 37 °C, pH-Wert = 7,3 und Sauerstoffpartialdruck $p_{O_2,min}$ = 40 $\%_{Luftsättigung}$, Arbeitsvolumen WV = 4,7 L.

Ist das Ende des Zellwachstums durch die Oberflächenlimitierung auf den konfluent bewachsenen Carriern erreicht, wird das Saatvirus hinzugefügt. Die Wirtszellen werden, je nach Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu uninfizierten Zellen (Multiplicity of Infection, MOI), sofort oder in mehreren Wellen infiziert. Der Sauerstoffverbrauch ist zu Beginn des zweiten Prozessschrittes (92 bis ≈ 110 h) durch die Zellen noch unvermindert hoch, geht dann jedoch aufgrund des Absterbens durch die Infektion der Zellen drastisch zurück, was den Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks erklärt. Das Ende des Sauerstoffverbrauchs kennzeichnet den Tod der Zellen. Der Anstieg des Partialdrucks auf über 100 $\%_{Luftsättigung}$ ab diesem Zeitpunkt ist durch die Begasung mit reinem Sauerstoff und dessen Anreicherung im Kopfraum des Reaktors, der mit der Konzentration im Nährmedium im Gleichgewicht steht, zu erklären.

Die Kultivierung ist beendet, wenn alle Zellen erfolgreich infiziert wurden, was sich durch den Tod der Zellen und anschließender Lyse äußert. Die anschließende Aufreinigung (Downstream-Processing) umfasst die Schritte

1. Trennung/Klärung,
2. Inaktivierung,
3. weitere Aufreinigung der inaktivierten Viruspartikel, die das Ausgangsmaterial für den Impfstoff bilden.

Ein Vergleich der Impfstoffproduktion per Zellkultur gegenüber der klassischen Produktion in Hühnereiern weist nur geringe Unterschiede in der Virusausbeute auf (Tree et al., 2001).

2 Modellierung von Bioprozessen

2.1 Grundlagen der mathematischen Modellbildung

Mathematische Modellbildung findet in vielen wissenschaftlichen Zweigen und im Ingenieurswesen seine Anwendung. In der chemischen Verfahrenstechnik sind mathematische Modelle beispielsweise zur Beschreibung von Reaktionsabläufen und Optimierung von Prozessen weit verbreitet. Biotechnologische Prozesse werden seltener durch mathematische Ansätze beschrieben, da diese wie alle komplexen Modellansätze in der Verfahrenstechnik meist nicht analytisch lösbar sind und gleichzeitig weniger Erfahrung zur Reduktion vorhanden ist als z.B. bei chemischen Prozessen. Beispielsweise können Stoffwechselwege in den Zellen variabel verlaufen, was eine mathematische Beschreibung erschwert. Vergleichsweise wenig quantitatives Grundlagenwissen ist über die einzelnen Reaktionsschritte und ihre Gewichtung vorhanden, da die Biologie bis vor kurzer Zeit eine deskriptive Wissenschaft war. Eine detaillierte Beschreibung aller ablaufenden Reaktionen ist aus diesen Gründen bislang unmöglich. Wünschenswert sind stark vereinfachte Modelle, die durch Reduktion komplexer Beschreibungen auf relevante Zustandsgrößen eine Beschreibung des Verlaufs weniger, und außerdem leicht messbarer Größen ermöglichen.

In biotechnologischen Prozessen, z.B. zur Produktion von hochmolekularen komplexen Proteinen (monoklonale Antikörper, Vakzinen) in tierischer Zellkultur, ermöglichen mathematische Modelle durch die Analyse der Prozesse ein besseres Verständnis. Als weiterer Nutzen neben der Optimierung eines Systems kann mit einem geeigneten Modell der Entwurf und Einsatz von Reglern zur Prozessführung realisiert werden. Ein guter Überblick, welchen Nutzen mathematische Modellierung in der Bioprozesstechnik hat, verbunden mit dem Einzug der Computertechnologie in diesen Bereich, ist in Dhurjati et al. (1990), Bailey (1998), Bungay (2000) und (Nielsen, 2000) zu finden. In den meisten etablierten Prozessen der Zellkultur, die der Virusproduktion dienen,

ist noch viel Forschungsbedarf vorhanden, was das Verständnis der Dynamik des Zellwachstums, der Virusreplikation, des Metabolismus und der komplexen Veränderungen der Zustandsvariablen im Bioreaktor anbelangt. Hier kann ein Modell helfen, unter Berücksichtigung von experimentellen Daten entweder auf zellulärer oder auf Prozessebene, mehr Wissen über das System zu bekommen oder Strategien zur Optimierung oder Regelung des Prozesses zu entwickeln. Die Modellbildung in der heutigen Bioprozesstechnik ist insofern von großem Interesse, als die Vorhersage des Verhaltens komplexer metabolischer Netzwerke innerhalb der Zelle oder auch die Bestimmung des Substratverbrauchs und der Metabolitenkonzentrationen im Bioreaktor ohne Modellbildung nicht möglich ist. Dabei können Modelle z.B. die Reaktionen innerhalb der Zelle erklären und auf diese Weise zum Verständnis dienen, zur Zustandsschätzung schwer bestimmbarer Größen (z.B. Zellzahlen) benutzt werden oder als Prozessmodell in modellbasierten Regelungen zum Einsatz kommen.

Zu Beginn der mathematischen Modellbildung für ein bestimmtes Problem stellt sich die Frage, welcher Art das Modell sein soll (physikalisch, mathematisch, usw.) und welchen Zweck es erfüllen soll (Dhurjati & Leipold, 1990). Ein mathematisches Modell eines biotechnologischen Prozesses z.B. hat den Anspruch

- das Verständnis des Bioprozesses (auf biologischer, chemischer oder physikalischer Grundlage) zu verbessern,
- schwer messbare Daten (z.B. Zellzahlen: uninfizierte Zellen, infizierte Zellen) zu gewinnen,
- Zustandsgrößen vorherzusagen (Inter- und Extrapolierung),
- Auswirkungen der Änderung von Prozessgrößen ohne die Durchführung von Experimenten zu testen,
- Unterstützung bei der Versuchsplanung zu geben,
- als Basis zur Auslegung eines Reglers zur Optimierung und Kontrolle

komplexer Prozesse zu dienen und

- die Formulierung von Hypothesen und die Datenanalyse zu unterstützen.

Modelle haben eine große Bandbreite bezüglich ihrer Komplexität und der theoretischen Grundlage (Tzampazis et al, 1994). Die Hauptunterscheidung liegt zunächst zwischen unstrukturierten und strukturierten bzw. nicht segregierten und segregierten Modellen (Frederickson, 1970; Bailey et al, 1986; Nielsen et al., 2003). Unstrukturiert meint, dass z.B. im Anwendungsfall der Modellierung einer tierischen Zelle der innere Aufbau der Zelle außer acht gelassen wird, während strukturierte Modelle die Zusammensetzung der Zelle berücksichtigen, z.B. eine Einteilung der Zelle in verschiedene Bereiche gleicher chemischer oder physikalischer Beschaffenheit (z.B. eine metabolische Strukturierung, wie die Unterteilung in Lipide, Kohlenhydrate, Proteine oder eine morphologische Strukturierung). Als Vorteil ergibt sich eine wesentlich bessere Extrapolierbarkeit strukturierter Modelle wohingegen ein unstrukturiertes Modell nur für einen engen Bereich Gültigkeit besitzt. Nachteilig wirkt sich der erhöhte mathematische Aufwand zur Formulierung eines detaillierten Modells und dessen analytischen oder numerischen Lösung, auch mit Computeranwendung, aus. Ebenfalls vergrößert sich der analytische Aufwand je mehr Zustandsgrößen in das Modell eingehen.

Nichtsegregierte Modelle betrachten alle Zellen als Durchschnittszellen und berücksichtigen nicht die Verschiedenheit der im realen Prozess befindlichen Zellen. Die Unterschiede können Größenverteilungen oder der Zustand in der Zellteilungsphase, produzierende und nicht produzierende Zellen sein. Entsprechend der strukturierten Modelle ist zu beachten, dass sowohl der mathematische als auch der analytische Aufwand mit weiteren Unterscheidungen steigen. Am einfachsten ist folglich ein unstrukturiertes nicht segregiertes Modell, sehr komplex hingegen ein strukturiertes segregiertes (Abbildung 3).

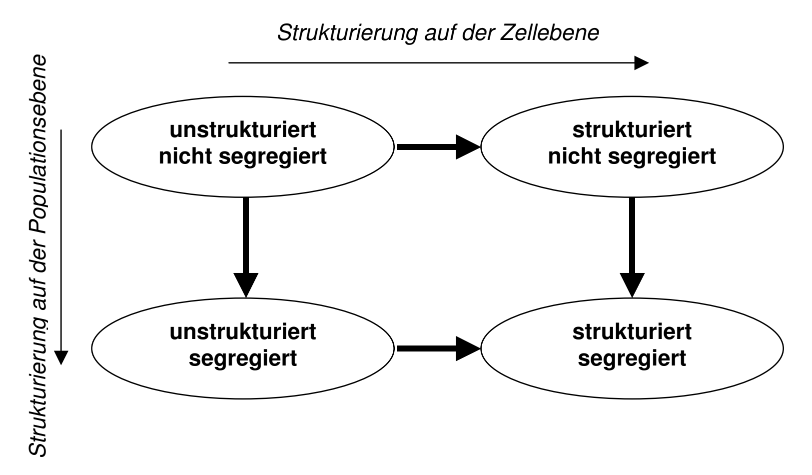

Abbildung 3: Klassifizierung verschiedener Modelltypen für Zellpopulationen (Frederickson, 1970; Bailey et al, 1986), nach Nielsen et al., (2003).

2.2 Vom Reaktor zum Modell: Bilanzgleichungen beschreiben das System.

Ein Modell ist ein Konzept zur vereinfachten Darstellung eines komplexen Systems. In der Bioprozesstechnik besteht ein mathematisches Prozessmodell in der Regel aus Differentialgleichungen, die unter Verwendung von impliziter oder expliziter Information verschiedene Zustände eines Prozesses beschreiben. Sind keine algebraischen Nebenbedingungen zu beachten, ergibt sich in der Regel ein Satz gewöhnlicher Differentialgleichungen (ordinary differential equations, ODE) der Form

$$\dot{y} = f(t, y, p). \qquad (1)$$

Dabei ist *t* die Zeit, *y* der Vektor der differentiellen Zustandsgrößen und *p* der Vektor der zeitkonstanten Parameter. Bei der Lösung von Anfangswertproblemen können die Anfangswerte entweder explizit in der Form

$$y(t_0) = y_0, \tag{2}$$

unabhängig von anderen Funktionen oder Parametern, oder implizit

$$0 = F_0(\dot{y}(t_0), y(t_0)), \tag{3}$$

als Funktion gegeben werden. In Hinblick auf Optimierungsprobleme kann es sinnvoll sein, die Anfangsbedingungen nicht vorzugeben, sondern auch als zu optimierende Größe einzurichten. Ebenfalls müssen im Allgemeinen diverse Ungleichheitsnebenbedingungen

$$0 \leq h(t, \dot{y}, y, p) \tag{4}$$

erfüllt sein (z.B. keine negative Substratkonzentration).

Die Beschreibung der sich ändernden Zustandsgrößen ist typischerweise vorteilhaft für eine geschlossene Kontrollregion, die homogen durchmischt ist. Anderenfalls, z.B. für Reaktoren größeren Maßstabs (Kubikmeterbereich) oder Säulenreaktoren, können Abschnitte mit örtlich homogen verteilten Bereichen definiert werden. Die Grenzen homogener Regionen können sein:

- Phasengrenzen ohne Austausch,
- Phasengrenzen mit Masse- oder Energietransfer oder
- geometrisch definierte Grenzen innerhalb einer Phase, über die ein Austausch möglich ist.

Das Schema eines idealen Rührreaktors zeigt Abbildung 4. Für extensive Zustandsgrößen, d.h. Eigenschaften, die im gesamten System additiv sind, kann in jeder Kontrollregion eine Bilanzgleichung mit der allgemeinen Form

$$\frac{dVy}{dt} = \underbrace{V \cdot \sum r_{gen}}_{\text{generierend}} - \underbrace{V \cdot \sum r_{cons}}_{\text{konsumierend}} + \underbrace{F_i y_i}_{\text{Input}} - \underbrace{F_o y_o}_{\text{Output}} \qquad (5)$$

Mit V = Volumen der Kontrollregion [L], r_{gen} = Bildungsrate [$L^{-1} \cdot h^{-1}$], r_{cons} = Verbrauchsrate [$L^{-1} \cdot h^{-1}$], F_i = Volumenstrom „Ein“ [L/h]; F_o = Volumenstrom „Aus“ [L/h]; y = Zustandsgröße [L^{-1}]; y_i = Zustandsgröße im Zufluss [L^{-1}]; y_o = Zustandsgröße im Abfluss [L^{-1}];

aufgestellt werden (Dhurjati & Leipold, 1990). Dabei entspricht $\Sigma\ r_{cons}$ der Summe aller verbrauchenden Raten, $\Sigma\ r_{gen}$ der Summe aller erzeugenden Raten innerhalb der Kontrollregion. Beispiele für extensive Zustandsgrößen der Bioprozesstechnik sind Zellzahl, Substratmenge, Produktmenge, O_2, CO_2, DNA, RNA, aber auch Redox- bzw. Energie-äquivalente (NADH und ATP).

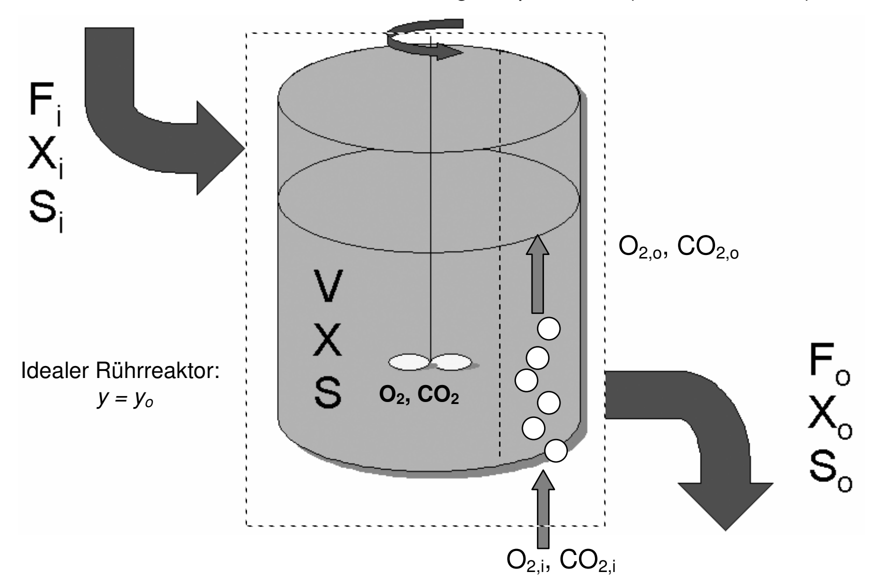

Abbildung 4: Schema eines idealen Rührreaktors: homogene Kontrollregion innerhalb des Volumens V mit Phasengrenze gas/flüssig und Austauschmöglichkeit für O_2 und CO_2, Zufluss und Abfluss. F: Flussrate [L/h], X: Zellzahl [Zellen/mL], S: Substratkonzentration [g/L oder mmol/L], Gas Einlass ($O_{2,i}$, $CO_{2,i}$) [mmol/L], Gas Auslass ($O_{2,o}$, $CO_{2,o}$) [mmol/L]; Index i = Eingang, Index o = Ausgang.

Je nach Art des Prozesses ergeben sich für *Batch*, *Fed-Batch* und *Perfusion* Kulturen verschiedene Randbedingungen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der Modellannahmen zur Beschreibung von Prozessführungsstrategien.

Kultivierungsform	Batch	Fed-Batch	Perfusion
Massenstrom	F_i *und* $F_0 = 0$	$F_i > 0, F_0 = 0$	$F_i = F_0 > 0$
Zellzahl	-	$X_i = 0$	$X_i > 0$ oder $X_i = 0$ $X_o \cong 0$
Substrat	-	$S_i > 0$	$S_i \geq S_o > 0$
Volumenbilanz	$\frac{dV}{dt} = F_i - F_o = 0$	$\frac{dV}{dt} = F_i - F_o = F_i$	$\frac{dV}{dt} = F_i - F_o = 0$
Zellbildung	$\frac{dx}{dt} = r_x$	$\frac{dx}{dt} = r_x + \frac{F}{V}(X_i)$	$\frac{dx}{dt} = r_x + \frac{F}{V}(X_i)$

Mit $r_x = \mu \cdot X$ Bildungsrate der Zellen

Nach dem Aufstellen der Differentialgleichungen und der parameterabhängigen Kinetiken, die den betrachteten Prozess beschreiben sollen, müssen diese Gleichungen integriert werden, um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Zustandsgrößen treffen zu können. Nach Möglichkeit wird nach einer analytischen Lösung zur Integration der Differentialgleichungen gesucht, die eine Zeitfunktion, die die Zustandsgröße beschreibt, liefert. In den meisten Fällen ist dies jedoch nicht möglich, so dass eine numerische Integration unter Berücksichtigung von Startwerten (Anfangswertproblem) das Differentialgleichungssystem löst. Die mathematischen Ergebnisse müssen in Hinblick auf die biologischen Grundlagen diskutiert und gegebenenfalls das Modell modifiziert werden. Anschließend können die Parameter bezüglich der Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den experimentellen Daten optimiert werden. Die Modellbildung kann somit in drei Hauptschritte unterteilt werden: Der „Ableitungsschritt“ (Aufstellung der Differentialgleichungen), der Lösungsschritt (Integration) und der Interpretationsschritt (Vergleich der Lösung mit dem erwarteten Ergebnis, Cushing 2004). Werden bei dem letzten Schritt

Schwächen des Modells entdeckt, z.B. Abweichung der Simulation zu den experimentellen Daten, ist eine Rückkopplung zum Ableitungsschritt vorgesehen (Feedback) und die Modellgleichungen werden modifiziert (Abbildung 5).

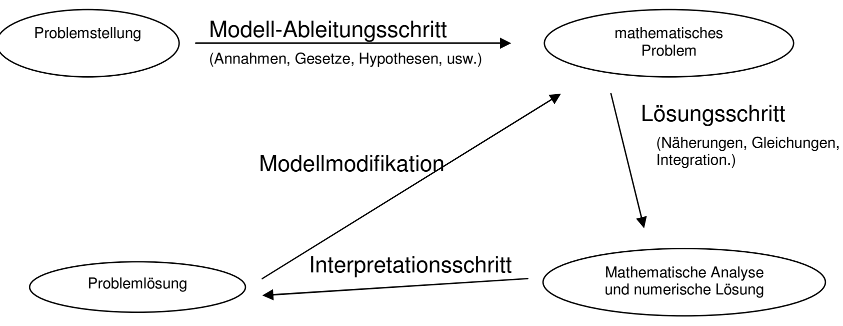

Abbildung 5: Der Modellierungszyklus (nach Cushing, 2004).

3 Stand der Forschung

3.1 Grundlagen zur Modellierung des Metabolismus

Modelle zur Beschreibung des Zellwachstums

Im Allgemeinen berücksichtigen Modellansätze zur Beschreibung des Wachstums tierischer Zellen die Aufnahme der Substrate Glucose und Glutamin und die Produktion der Inhibitoren Lactat und Ammonium (Jang and Barford, 2000; Bree et al., 1988; Glacken et al., 1988). Glutamin wird nicht ausschließlich von den Zellen aufgenommen, sondern zerfällt desto schneller zu Ammonium und Pyrrolidoncarboxylsäure je höher die Temperatur und je höher der pH-Wert sind (Otzturk et al., 1990). Neben dynamischen (zeitabhängigen) Modellen, die die Anpassungs-fähigkeit der Zellen auf die sich ändernde Kulturumgebung berücksichtigen (BHK, Teixeira et al., 2005; Linz et al., 1997), existieren Modellbeschreibungen, die unter steady-state Bedingungen eine zeitunabhängige Stoffflussanalyse erlauben. Diese Vorgehensweise liefert ein wesentliches Hilfsmittel zur schnellen Bestimmung des Status einer Zellkultur und eröffnet die Möglichkeit, Verbesserungen der Zufütterungsstrategien zu entwickeln (Nadeau et al., 2000). Die Prüfung der Konsistenz des Metabolischen Netzwerkes mit Hilfe der Stoffflussanalyse kann als Grundlage eines dynamischen Modells herangezogen werden (Provost und Bastin, 2004). Im Weiteren sollen nur dynamische Modelle betrachtet werden. Eine Übersicht der Fortschritte in der Überwachung, Modellierung und Regelung von Bioprozessen der 80er und 90er Jahre gibt Schügerl (2001). Die Modellierung von Zellkulturprozessen wird allgemein in Tziampatis und Sambanis (1994) beschrieben. Einen Überblick über unstrukturierte Modelle für Wachstum von Hybridomazellen und Metabolitenproduktion geben Pörtner et al. (1996a).

Hauptstoffwechselwege

Der Metabolismus von MDCK-Zellen im Prozess zur Influenza Virus Herstellung ist wenig erforscht. Zur Energiegewinnung nutzen die Zellen hauptsächlich Glucose (Kohlenstoffquelle) und Glutamin (Stickstoffquelle). Glutamin spielt somit gegenüber anderen Aminosäuren eine hervorgehobene Rolle. Die Nutzung zweier Substrate zur Energieproduktion bietet der tierischen Zelle Vorteile bei Engpässen in der Versorgung (Vriezen et al., 2001). Eine Begrenzung der Stickstoffquelle kann durch die erhöhte Aufnahme von anderen Aminosäuren ausgeglichen werden (Vriezen et al., 2001).

Glucoseabbau

Glucose wird zu 92 bis 96 % über die Glykolyse und zu einem geringen Teil über den Pentosephosphatweg im Cytosol zu Pyruvat abgebaut (Häggström, 2000), (Abbildung 6). Zum Großteil (90 %) wird Pyruvat zu Lactat reduziert, das von der Zelle ausgeschleust wird und im Medium akkumuliert (Vriezen et al., 2001; Guardia et al., 2000). Dies bedeutet eine nur geringe Nutzung von Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle und ergibt einen niedrigen Wert des spezifischen Ausbeutekoeffizienten der Zellzahl bezogen auf den Glucoseverbrauch ($Y_{X/Glc}$).

Glutaminabbau

Der erste Schritt des Glutaminabbaus ist im Cytosol die Deamidierung zu Glutamat bei gleichzeitiger Freisetzung von Ammonium, das von der Zelle ausgeschieden wird und sich im Medium anreichert. Zur Weiterführung des Glutamats über das α-Ketoglutarat (α-KG) in den Citratzyklus (tricarboxylic acid cycle, TCA) gibt es zwei Hauptstoffwechselwege, den Glutamat Dehydrogenase Stoffwechselweg (GDH) und den Transaminierungsweg (TA). Der TA ist stöchiometrisch an die Transaminierung von Pyruvat zu Alanin (Hybridoma, CHO) bzw. Oxaloacetat zu Aspartat (MDCK) gekoppelt (Häggström, 2000), was eine Akkumulation von Alanin bzw. Aspartat im Medium zur Folge hat. Hauptsächlich wird der GDH genutzt, der eine Ammoniumproduktion hervor-

ruft. Im Citratzyklus kann α-KG über Malat und Pyruvat als Lactat ausgeschieden oder vollständig zu CO_2 oxidiert werden.

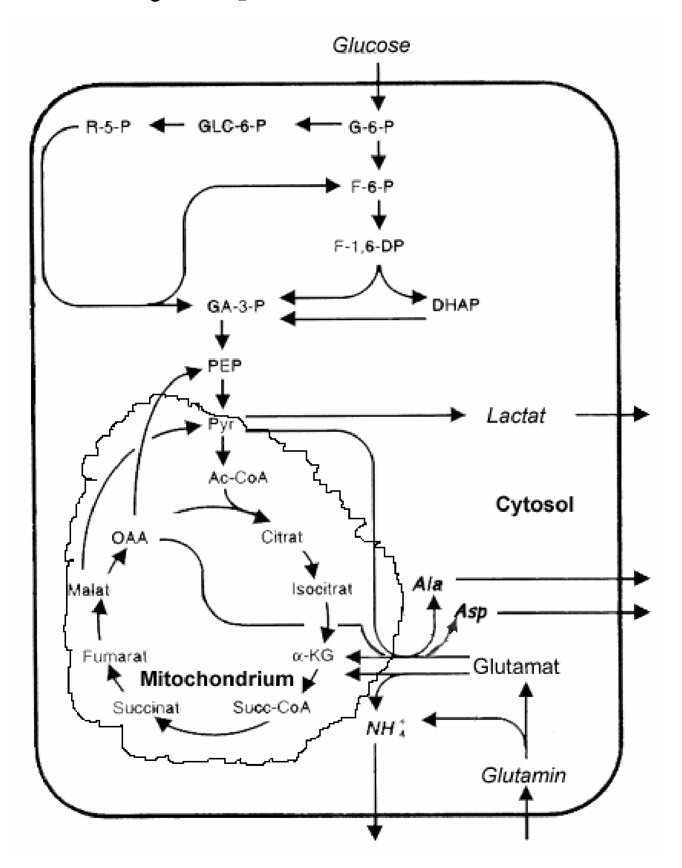

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Glucose- und Glutaminkatabolismus für tierische Zellen, kursive Komponenten bezeichnen Metabolite, die aus dem Medium aufgenommen bzw. ans Medium abgegeben werden (nach Vriezen et al., 2001).

Inhibitoren

In höherer Konzentration wirken sowohl Lactat (ab etwa 50 mM; Schmid, 1992) als auch Ammonium (etwa 2 bis 10 mM; Cruz et al., 2000; Schneider et al., 1996; Ozturk, 1999) inhibitorisch auf das Wachstum vieler Zelllinien. Weiterhin sind Überlagerungseffekte von Lactat und Ammonium, die zu einer weiteren Einschränkung des Zellwachstums führen, bekannt (Hassel et al., 1991). Das aus der Zelle ausgeschleuste Lactat sorgt für eine Senkung des pH-Wertes im Medium, was durch eine geeignete pH-Regelung ausgeglichen werden kann. Ammonium hat Einfluss auf elektrochemische Gradienten und Änderungen im intrazellulären pH-Wert (Vriezen et al., 2001). Durch die dadurch resultierenden notwendigen Elektronentransportprozesse zum Ausgleich der elektrochemischen Gradienten erhöht sich der Energieaufwand des Erhaltungsstoffwechsels (Häggström, 2000).

Verschiedene Möglichkeiten zur Vermeidung von hohen Inhibitorenkonzentrationen sind bekannt. Zum einen besteht die Möglichkeit, durch glutaminfreie Medien die Ammoniumproduktion zu unterbinden (Genzel et al., 2005; Mc Dermott et al., 1993). Glutamin ist jedoch neben der Funktion als Energielieferant Grundlage für die Synthese nichtessentieller Aminosäuren, so dass diese in glutaminfreien Medium ausreichend vorhanden sein müssen (Eagle, 1955; Xie & Wang, 1994). Zum anderen kann durch geeignete Zufütterungsstrategien und die genaue Dosierung von Glucose bzw. Glutamin in einer zum Wachstum gerade ausreichenden Konzentration die übermäßige Produktion der jeweiligen Inhibitoren vermieden werden (Glacken et al., 1986; Biener et al., 1996, 1997, 1998; Frahm et al., 2002, 2003; Pörtner et al., 2004). Glacken et al. (1986) und Goergen et al. (1992) berichten über einen Rückgang der Ammoniumproduktion um 40 % bei Führung der Glutaminkonzentration unter 1 mM, jedoch zeigt Doverskog et al. (1997), dass eine Mindestkonzentration von 0,5 mM Glutamin für Hybridomazellen vorhanden sein muss, um ein Sterben der Zellen zu vermeiden.

Stoffwechselmodelle

Für die Modellierung des Metabolismus tierischer Zellkulturen zur Grundlagenforschung und zur modellgestützten Regelung von Zellkulturprozessen sind zahlreiche Arbeiten vorhanden. Der Hauptteil der Publikationen bezieht sich auf Suspensionszellen zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (Xie et al., 1994; Pörtner et al., 1996b). Grundlegende Arbeiten befassen sich mit der Regelung der Zufütterung und damit verbundener Reduktion des Levels der Inhibitoren Lactat und Ammonium (Glacken et al., 1986; Li et al., 2005). Ebenfalls wurde eine Anlage einer Antikörperproduktion im Labormaßstab (Biener, 1998) beschrieben, die unter Einbindung eines mathematischen Modells eine optimierte Prozessführung und Prozessüberwachung erlaubt. Diese Verfahren können eine wesentliche Verbesserung der Prozesssicherheit und Ausbeutesteigerung erzielen. Ein strukturiertes kinetisches Modell wurde von Batt & Kompala (1988) publiziert, welches die Zelle in vier Kompartimente (Lipide, Nucleotide, Aminosäuren und Proteine) einteilt. Es werden die Substrate Glucose und Glutamin und die Produkte Lactat und Ammonium berücksichtigt. Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigten sich mit den Kultivierungsbedingungen von Hybridoma und dem Einfluss der Glutaminkonzentration in der Substratzufütterung auf die Zellzahl, Verbrauchs- und Produktbildungsraten und die Ausbeutekoeffizienten (Goergen et al., 1996; DiMasi & Schwartz, 1995; Schmidt et al., 1992). Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist die Modellierung des Stoffwechsels von BHK Zellen, dessen Metabolismus im Vergleich mit anderen tierischen Zellen eine besondere Anpassungsmöglichkeit aufweist (Cruz, 1999; Mittal, 2000). Je nach Vorkultur und Substratkonzentration im Zufluss werden Stoffwechselwege genutzt, die zu unterschiedlichen Wachstumsraten führen. Entsprechend Ergebnissen, die bei der Untersuchung von Hybridomazellen (Guardia et al., 2000) erhalten wurden, besitzen auch diese Zellen je nach Vorkultur verschiedene Steady-States im Stoffwechselnetzwerk, die zu verschiedenen spezifischen Wachstumsraten führen. Mithilfe der kybernetischen Modellierung können diese gefunden werden und eine Optimierung des Prozesses erlauben. Eine neue Richtung weisen so

genannte „Greybox-Modelle“. Hierbei handelt es sich um Hybridmodelle, in denen parallel zu einem detaillierten mathematischen Modell ein Blackbox-Modell geschaltet wird. Schwierigkeiten bei der Parameterbestimmung des mathematischen Modells können somit umgangen werden (Galvanaukas et al., 2004; Teixeira et al., 2005).

Wenige Arbeiten beschäftigen sich mit der Modellierung des Wachstums adhärenter Zellen und insbesondere der Berücksichtigung der Einschränkungen durch den begrenzten Platz auf Microcarriern. Arbeiten, die das Wachstum von adhärenten Zellen auf Microcarriern modellieren, berücksichtigen in der Regel den Zellmetabolismus nicht (Frame & Hu, 1988; Forestell, 1992b; Hawboldt, 1994). Der Metabolismus von adhärenten MDCK Zellen unter Produktionsbedingungen ist nur wenig erforscht. Jedoch sind grundlegende Untersuchungen zur Kultivierung dieser Zelltypen vorhanden. Eine der ersten Arbeiten von van Wezel (1967) wie auch folgende Arbeiten beschreiben die Kultivierung verschiedener Zelllinien (Vero, CHO-K1, MDCK, Hepatozyten) und untersuchen die Nutzungsmöglichkeiten von Rührkesselreaktoren mit Microcarriern (Butler, 1985; Lee et al., 1992; Kwon et al., 2002), bzw. Festbettreaktoren (Kurosawa et al., 2002; Durrschmid et al., 2003). Zur Modellierung der Wachstumseinschränkungen durch die limitierende Oberfläche der Microcarrier können folgende Annahmen für die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate vom Grad der Konfluenz gestellt werden:

1. Die spezifische Wachstumsrate μ ist konstant, während die Zellzahl weit unterhalb des möglichen Wertes bei Konfluenz liegt.
2. Die spezifische Wachstumsrate μ ist null, wenn die Zellen Konfluenz erreicht haben.
3. Die spezifische Wachstumsrate μ soll zwischen diesen beiden Extrempunkten einen fließenden Übergang haben und das Zellwachstum qualitativ und quantitativ wiedergeben können.

Verschiedene Ansätze wurden zur Beschreibung zwischen der spezifischen Wachstumsrate und dem Grad der Konfluenz vorgestellt. Es ergeben sich für die einzelnen Ansätze folgende Nachteile. Ein logistischer Modellansatz, erstmalig angewendet auf das Wachstum von Mikroorganismen von M'Kendrick und Pai (1911), auf einen Zellwachstumsprozess mit Carriern übertragen, begrenzt die maximale spezifische Wachstumsrate bevor die Oberfläche der Microcarrier vollständig bewachsen ist (Konfluenz). Das Zellwachstum wird dadurch schlecht abgebildet. Frame and Hu (1988) schlagen ein deterministisches Modell vor, um die Unzulänglichkeiten einer logistischen Betrachtungsweise zu eliminieren. Bei diesem empirischen Modellansatz wird davon ausgegangen, dass alle Zellen gleichermaßen kontaktinhibiert werden. Das ist jedoch nicht der Fall: Zellen am Rand des Zellverbandes können ungehindert wachsen, hingegen sind Zellen im Inneren des Verbandes kontaktinhibiert. Cherry und Papoutsakis (1989) präsentierten ein mechanistisches Modell, das eine Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate derart berücksichtigt, dass nur Zellen am Rand des Zellverbandes mit der spezifischen Wachstumsrate μ wachsen. Hingegen gilt für die kontaktinhibierten Zellen im Inneren $\mu = 0$. Auch wenn diese Betrachtungsweise realistischer ist, wird das Vorhandensein mehrerer Zellverbände auf einem Carrier nicht berücksichtigt. Ebenfalls wird in diesem Modell die Anzahl von Zellen am Rand eines kleinen Zellverbandes überschätzt, was im Vergleich zum Prozess zur Überschätzung der Wachstumsrate führt.

Lim and Davies (1990) entwickelten ein stochastisches Modell, das die Topologie der Zellkolonien mit berücksichtigt. Die Zellen werden in Form von unregelmäßigen Polygonen dargestellt, die sich nur zu bestimmten Zeitpunkten vermehren können, wenn mindestens eine der Seiten des Polygons frei ist. Die Ausbreitungsrichtung bei mehreren freien Seiten wird dabei zufällig gewählt. Das Modell bietet den Vorteil, dass unabhängige Zellverbände zusammenwachsen können und dadurch die Wachstumsrate reduziert wird. Das Modell berücksichtigt nur eine zweidimensionale Ausdehnung und nicht die

Raumkoordinaten eines Microcarriers. Als Weiterführung haben Zygourakis et al. (1991) die Grundlagen für ein Modell eines zellulären Automaten gegeben. Die Dynamik des Zellwachstums auf Microcarriern wird anhand eines Toroids als Repräsentant für die Oberfläche simuliert. Dabei wurden jedoch keine experimentellen Vergleiche vollzogen. Die präzise Darstellung des kontaktinhibierten Zellwachstums, die durch das Automatenmodell erreicht wird, nutzten Forestell et al. (1992b) zu dessen Anwendung auf das Wachstum von humanen Fibroblasten (MRC-5). Die Autoren lieferten einen Vergleich von experimentellen Daten mit Simulationsergebnissen unter verschiedenen Einsaatzelldichten. Zur Vereinfachung wurde dabei der Microcarrier als ein 60-Flach (pentagonales Hexacontrahedron, Anhang 1) abgebildet. Jede der 60 Flächen besitzt Grenzen zu je 5 Nachbarzellen. Auch wenn Simulationen dieses Modells eine gute Übereinstimmung zu den experimentellen Daten (MRC-5 auf Cytodex 1) zeigen, ist bei Änderung der verwendeten Zelllinie oder des Carriertyps nur eine Übertragung auf Systeme möglich, bei denen die maximale Zellzahl pro Carrier etwa 60 beträgt. Außerdem ist dieses Modell begrenzt auf ein festes Verhältnis von Zellen pro Carrier und Nachbarzellen pro Zelle. Grundlegende Untersuchungen zu der Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens vom Verhältnis der Einsaatzellzahl zur Microcarrierdichte lieferten bereits Hu et al. (1985; humane Fibroblasten, FS-4). Die Autoren stellten einen Vergleich der experimentellen Daten mit einer mechanistischen Modellvorstellung vor.

Ruaan et al. (1993, CHO) präsentierten als Weiterführung des stochastischen Modells (Lim & Davis, 1990) eine Erweiterung um die Möglichkeit für die Zellen, auf der Carrieroberfläche wandern zu können. Somit können sich auch im Inneren des Zellverbandes Zellen teilen und frei werdenden Platz nutzen. Dieses Modell ist wie das von Lim und Davis auf eine ebene Oberfläche begrenzt. Modifiziert durch Hawboldt et al. (1994) wurde das Modell des zellulären Automaten um die Variation der Verhältnisse von Zellen pro Carrier und Nachbarzellen pro Zelle erweitert. Damit ist es universell für verschiedene

Zelllinien und Microcarrier einsetzbar. Ein Vergleich mit Vero und MRC-5 Zellen lieferte unter Berücksichtigung einer einfachen Monod-Kinetik für ein unbestimmtes Substrat gute Übereinstimmungen der Simulationen mit den experimentellen Ergebnissen.

Modelle zur Zustandsschätzung

Von großer Bedeutung zur Optimierung und zur robusten Kontrolle eines Prozesses ist die Bestimmung der Zellzahl, die ein wichtiges Merkmal bei der Prozesskontrolle insbesondere von Hochzelldichtekulturen ist, bei denen bedingt durch hohe Stoffwechselraten eine Limitierung der Substrate und die Akkumulation von Inhibitoren vermieden werden müssen (Nayve Jr. et al., 1994; Sonnleitner et al., 1992). Hauptsächlich dienen alle Modellbeschreibungen der Schätzung der Zellzahl. Die Bestimmung der Zellzahl, insbesondere von adhärenten Zellen, ist mit großen Fehlern verbunden (30 % Standardabweichung vom Mittelwert, Kapitel 4.2.1). Weiterhin ergibt sich abhängig vom verwendeten Messverfahren (z.B. Trypanblau-Färbung, dielektrische Spektroskopie, Fluoreszenz-Färbung, kapazitive Messung) eine unterschiedliche Klassifikation der Lebendzellzahl. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Messverfahren sind nicht direkt miteinander vergleichbar.

Nur wenige Arbeiten befassen sich mit der Zustandsschätzung, die mithilfe eines Kalman- oder Butterworthfilters vorgenommen werden kann. Eine der ersten Arbeiten befasste sich mit der Abschätzung der Zelldichte in einer Bakterienkultur anhand on-line verfügbarer Prozessgrößen (Swiniarski et al., 1982). Für Vero Zellen wurde ein Schätzverfahren zur Bestimmung der Zellzahl entwickelt, das sich auf die Messwerte von Glucose, Ammonium und einer Auswahl von Aminosäuren, die in dem Prozess gemessen werden, bezieht (Chotteau et al., 1995). Claes und Van Impe (1999) publizierten einen Schätzer zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate einer Hefekultur, der über die auf diese Weise erhaltene Information der Vitalität eine Regelung des Prozesses ermöglicht.

3.2 Modelle zur Beschreibung der Virusdynamik

Einleitung

Trotz der großen Bedeutung von Infektionskrankheiten und dem weit verbreiteten Gebrauch von tierischen Zellkulturprozessen im Bereich der Impfstoffherstellung ist die Anwendung von unstrukturierten mathematischen Modellen zur quantitativen Beschreibung oder zum besseren Verständnis der Virusreplikation in Säugerzellkulturen wissenschaftlich bisher kaum untersucht worden. Derzeit sind Untersuchungen der Herstellung von Influenzavirus in MDCK Zellen begrenzt auf Charakterisierung des Metabolismus oder Klassifizierung verschiedener Zelllinien in unterschiedlichen Produktionssystemen (Kessler et al., 1999; Genzel et al., 2001, Tree et al., 2001; Genzel et al., 2004). Verschiedene Modellbeschreibungen existieren für die Virusdynamik des Zell-Virus-Systems, die in drei Hauptgruppen einzuteilen sind: Die Beschreibung der Virusausbreitung

1. innerhalb einer Population,
2. innerhalb eines Organismus und
3. die Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle.

Virusdynamik am Beispiel von HIV

Modelle, die die Virusdynamik anhand von immunologischen Aspekten von Infektionskrankheiten betrachten, wurden von Nowak et al. (1990) eingeführt und behandeln die Modellierung der Virusausbreitung des humanen Immunschwäche Virus (HIV) im Individuum. Deren Modell zur Virusdynamik *in vivo* (Abbildung 7) beschreibt die Änderung der drei Zustände uninfizierte Zellen (U_C), infizierte Zellen (I_C) und freie Viruspartikel (V) (Nowak & May, 2000), das auch als Grundlage für das hier vorgestellte Virusreplikationsmodell dient. Es dient ebenfalls als Grundlage vieler Forschergruppen zur Berechnung der Viruslast (burst size) und der Wurfgröße (basic reproductive ratio) *in vivo* herangezogen (Herrmann et al., 2003, 2004; Powers et al., 2003; Dixit et al.,

2004; Bocharov et al., 2004). Das Ziel der genannten Forschergruppen ist die Untersuchung der Faktoren, die eine Verringerung der Virusausbreitung im Organismus ermöglichen. Die mathematische Analyse dieses Modells durch Perelson und Nelson (1999, 2002), und Gilchrist et al. (2004) trägt zum Verständnis der zeitlichen Abläufe der schnellen HIV Infektion und des langsamen Ausbruchs des erworbenen Immunschwäche-Syndroms bei, was die Möglichkeiten einer medikamentösen Behandlung verbessert.

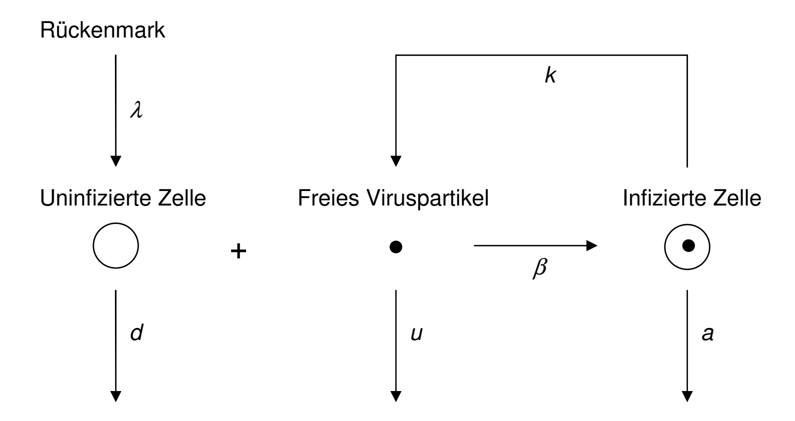

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Modells zur Virusdynamik: Uninfizierte Zellen „reagieren“ mit freiem Virus zu infizierten Zellen mit einer Reaktionsrate β. Infizierte Zellen produzieren freie Viruspartikel mit einer Rate k. Uninfizierte Zellen, freie Viruspartikel und infizierte Zellen sterben mit je einer Rate d, u bzw. a. Uninfizierte Zellen werden mit einer konstanten Rate λ produziert. Nach Nowak & May (2000).

Unstrukturiertes Modell zur Virusdynamik

Das Modell zur Beschreibung der Viruslast von HIV *in vivo* beinhaltet die Annahme, dass die uninfizierten Zellen mit einer konstanten Rate λ vom Rückenmark produziert werden und die Anzahl der freien Viruspartikel nicht durch ein Binden an die uninfizierten oder infizierten Zellen geschmälert wird, sondern dies in der Bildungsrate k berücksichtigt werden kann. Ziel der Simulationsstudien ist die Ermittlung, wie eine Neuinfektion (*de novo* Infektion) der gesunden Zellen verhindert werden kann: Dazu kann entweder die Replikation neuer Viruspartikel k, bzw. die Infektion uninfizierter Zellen β vermindert werden oder die Abnahme von Virus u bzw. das Absterben der infizierten Zellen a beschleunigt werden. Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, welche Faktoren für eine Erhöhung der Virusausbeute sorgen.

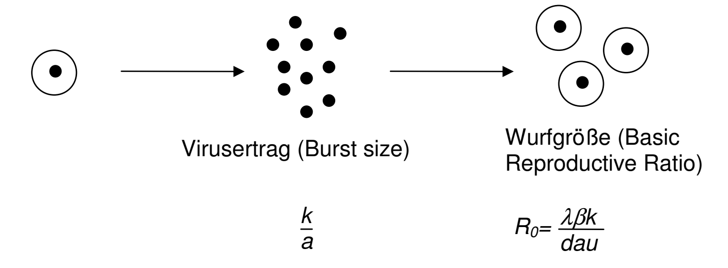

Abbildung 8: Virusertrag und Wurfgröße des Virus-Zell-Systems: Der Virusertrag (Burst Size) gibt die Anzahl der Viruspartikel an, die pro Zelle gebildet werden, die Wurfgröße (Basic Reproductive Ratio) ist das Verhältnis der Anzahl der neu entstandenen infizierten Zellen, zu einer einzelnen infizierten Zelle zum Zeitpunkt der Infektion (vorausgesetzt eine ausreichende Anzahl von uninfizierten Zellen ist zum Zeitpunkt der Infektion vorhanden). Nach Nowak & May (2000).

Eine Charakterisierung des Prozesses kann mit Hilfe des Virusertrags (Burst Size) und der Wurfgröße (Basic Reproductive Ratio) R_0 vorgenommen werden (Abbildung 8): Der Virusertrag beschreibt, wie viele Viruspartikel pro Zelle produziert werden können, die Wurfgröße gibt an, welche Anzahl von Neuinfektionen (*de novo* Infektion) eine infizierte Zelle bei ausreichender Anzahl uninfizierter Zellen zum Zeitpunkt der Infektion hervorrufen kann. Dabei wird davon ausgegangen, dass für eine Verringerung der Viruslast die Bedingung

$R_0 < 1$ erfüllt sein muss. Der Zusammenhang

$$R_0 = \frac{\lambda \cdot \beta \cdot k}{d \cdot a \cdot u} \qquad (6)$$

zeigt auf, dass mehrere Kombinationsmöglichkeiten der Parameter diese Ungleichheitsbedingung erfüllen können. Aus diesem Modell zur Beschreibung der Viruslast *in vivo* kann ein grundlegendes unstrukturiertes Modell für die Virusdynamik *in vitro* abgeleitet werden. Es wurden verschiedene Modellierungen zur Beschreibung des Infektionsprozesses *in vivo* von Hepatoviren (Dahari et al., 2005; Medley et al., 2001; Zhao et al., 2000), von HIV (Funk et al., 2001; Krogstad et al., 1999) oder der Dynamik des humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV) *in vivo* (Eshima et al., 2001; Wodarz et al., 1999) publiziert. Die Anwendung solcher Modelle zur Beschreibung oder Regelung der Prozesse zur Impfstoffproduktion ist bisher noch nicht geschehen. Am besten ist derzeit sowohl die Modellbildung als auch die experimentelle Untersuchung im Bereich der Produktion des Baculovirus in Insektenzellen zur Produktion von Biopestiziden und rekombinanten Proteinen vorangeschritten (Licari & Bailey, 1992; De Gooijer et al., 1992, Dee & Shuler, 1997a; Jang et al., 2000; Nielsen, 2000).

Strukturiertes Modell der Virusdynamik

Eine andere Möglichkeit der Modellierung der Virusreplikation kann ein strukturiertes Modell sein, das verschiedene Zellkompartimente (Membran, Endosom, Cytosol, Zellkern) betrachtet. Die mathematische Beschreibung der Raten des Viruseintritts, der Transskription, der Translation und der Expression von Virusprotein, können auf der Grundlage von genetischen und molekularmechanistischen Daten aufgestellt werden. An dieser Stelle sei auf Nunes-Correia et al. (1999) und Sidorenko & Reichl (2004) verwiesen, die dies detailliert vorstellen.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur und Virusreplikation

Die adhärenten MDCK Zellen (ECACC, UK; #84232903) aus einer Rollerflaschenvorkultur ((2 bis 3)·10^5 Zellen/mL) werden abtrypsiniert und mit dem Wachstumsmedium (GMEM mit zusätzlich 1 g/L Glucose, 10 % fötales Kälberserum (FCS), 2 g/L Pepton und 4 mg/mL $NaHCO_3$) in den Rührreaktor mit 4,6 L Arbeitsvolumen gegeben. Während 4 Tagen Batchkultur werden die Zellen auf 1,7 g/L Cytodex 1 Microcarriern unter Kontrolle des pH (7,3), Temperatur (37 °C), Rührerdrehzahl (50 U/min) und einer gepulsten Sauerstoffbegasung, die einen Sauerstoffpartialdruck von mindestens 40 $\%_{Luftsättigung}$ garantiert, auf etwa (1,2 bis 1,5)·10^6 Zellen/mL bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Virusreplikation werden nach einem Waschschritt das Virusmedium (Wachstumsmedium ohne FCS, Viruslösung (10 mL A/Equi 2 (H3N8) Newmarket 1/93, 2,1 bis 2,4 log HA Einheiten/100 µL; 1,2·10^7 plaque forming units/mL, Mahy & Kangroo, 1996) und Trypsin (12,5 mg/L) zugegeben. Die MOI beträgt 0,026 (≈ 3,0·10^4 infektiöse Viruspartikel/mL auf 1,2·10^6 Zellen/mL). Für die Regelung des Sauerstoffgehalts, des pH-Wertes und der Temperatur wird ein Prozessleitsystem von Siemens verwendet. Details sind in Genzel et al. (2004) zu finden.

4.2 Verfahren zur Messwerterfassung und statistische Sicherheit

Zur Schätzung der Modellparameter und zur anschließenden Verifizierung der Modelle werden folgende experimentell gewonnenen Daten ausgewertet: Für das Zellwachstumsmodell die Zellzahl, die Substrate Glucose und Glutamin und die Inhibitoren Lactat und Ammonium, für das Virusreplikationsmodell die Anzahl uninfizierter Zellen, infizierter Zellen und Viruspartikel. Die Methoden zur Messwerterfassung und deren Fehler werden im Folgenden beschrieben.

4.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen auf den Microcarriern und der lebenden bzw. toten Zellen in Suspension werden durch Trypan Blau Färbung mittels eines Haemacytometers (Doyle & Griffith, 2000) festgestellt. Hierzu wird ein definiertes Probevolumen aus dem Reaktor entnommen, die Suspensionszellen im Überstand werden direkt eingefärbt und ihre Anzahl im Haemacytometer bestimmt. Tote Zellen färben sich blau ein, lebende nicht. Die Zellen auf den sedimentierten Microcarriern müssen zunächst mit Trypsin abgelöst werden. Es ergeben sich unterschiedliche Fehlerquellen:

1. Die Anzahl der Zellen in der Zählkammer (Volumen 1 µL) unterliegt bei der Reduzierung des Probevolumens statistischen Schwankungen,
2. trotz festgelegter Zählstrategie können sich je nach Mitarbeiter verschiedene Auslegungen in der Strategie ergeben,
3. die Anzahl der Microcarrier, die sich in der Probe befinden, unterliegt statistischen Schwankungen (Promotionsschrift Bock, in Vorbereitung).

Weiterhin beeinflusst die Zellverteilung auf den Microcarriern die Anzahl der Zellen im Probevolumen. Nicht alle Microcarrier werden zu Beginn der Kultur mit Zellen besetzt, eine Migration der Zellen von Microcarrier zu Microcarrier während der Kultur findet nicht statt, so dass sich zum Teil sogar leere Microcarrier finden lassen. Bei dieser Methode ergibt sich eine relative Standardabweichung bei der Zählung angehefteter Zellen mit bis zu 30 % Streuung um den Mittelwert. Die Daten der F86 wurden mit einer verbesserten Zählmethode bestimmt, bei der die Anzahl der Microcarrier im Probevolumen mit berücksichtigt wird. Hier beträgt die Streuung um den Mittelwert 15 %.

4.2.2 Bestimmung der Metabolite

Die Konzentrationen von Glucose, Glutamin, und Lactat werden über automatisierte Enzymtests mit einem YSI 7100 in einer Doppelbestimmung bzw. mit einem Bioprofile 100 in einer Einfachbestimmung gemessen. Die Ammoniumkonzentration wird mit einem Vitros DT60-II bzw. mit dem Bioprofile 100 gemessen. Tabelle 2 zeigt die Nachweisgrenzen, Quantifizierungsgrenzen und den relativen Standardfehler der jeweiligen Messmethode. Details zur Validierung finden sich in den Protokollen der Arbeitsgruppe. Liegt der Wert der Probe oberhalb des linearen validierten Messbereichs, wurde eine entsprechende Probenverdünnung vorgenommen und der tatsächliche Wert aus der Messung berechnet.

Tabelle 2: Nachweisgrenze, Quantifizierungsgrenze und relativer Standardfehler der Substrate und Inhibitoren.

	Nachweisgrenze		Quantifizierungsgrenze		rel. Standardfehler		
	Bioprofile	YSI	Bioprofile	YSI	Bioprofile	YSI	Vitros
Glucose	2,8 mM	0,9 mM	1,1…41,1 mM	2,9…27,8 mM	1,3%	0,6%	
Glutamin	0,17 mM	0,25 mM	0,2…2,6 mM	0,2…2,6 mM	1,2%	1,7%	
Lactat	2,1 mM	1,3 mM	2,3…27 mM	3,4…23,6 mM	1,5%	1,0%	
Ammonium	0,4 mM	0,1 mM	0,2…5,2 mM	0,03…0,35 mM	1,5%		5,3%

4.2.3 Bestimmung der Viruspartikel

Um eine Schätzung der Modellparameter vollständig vornehmen zu können, ist die Bestimmung der Anzahl von Viruspartikeln notwendig. Zur Herstellung eines inaktivierten Impfstoffes die Anzahl aller im Prozess entstehenden Influenza Viruspartikel von Interesse, die eine Antikörperreaktion verursachen, und das Ausgangsmaterial für den Impfstoff liefern. Hingegen ist zur Infektion der Zellkultur die Bestimmung der infektiösen Viruspartikel notwendig und üblich. Zur Bestimmung der jeweils interessierenden Werte werden die zwei folgenden Methoden angewandt.

Haemagglutinations-Test (HA-Test) zur Bestimmung der Gesamtzahl an Viruspartikeln

Die Gesamtzahl von Viruspartikeln wird durch den Haemagglutinations-Test (HA-Test; Mahy & Kangroo, 1996; Gould & Clegg, 1985; Barrett & Inglis, 1985) bestimmt. Eine Beschreibung der Durchführung des HA-Test befindet sich im Anhang (A9). Aus der Endpunkttitration lässt sich die Anzahl der Viruspartikel mit einem relativen Fehler von ± 0,15 log HA Stufen berechnen. Aus der Anzahl der Viruspartikel, die theoretisch pro Erythrozyt binden, kann die absolute Anzahl der Viruspartikel und der absolute Fehler für das entsprechende Intervall berechnet werden. Unter der Annahme, dass zwei Viren pro Erythrozyt binden und $2{,}03 \cdot 10^6$ Erythrozyten pro Well (100 µL) eingestellt werden (A9) ergibt sich als Nachweisgrenze rechnerisch eine Anzahl von $4{,}06 \cdot 10^7$ Viruspartikel/mL.

$$n_{Virus} = \frac{V}{Z} \cdot c_{RBC} \cdot F \qquad (7)$$

mit n_{Virus} = Anzahl der Viruspartikel [mL^{-1}], V = mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmte Anzahl von Viruspartikeln [mL^{-1}], Z = Anzahl von Erythrozyten [mL^{-1}], c_{RBC} = Anzahl der roten Blutkörperchen [mL^{-1}], F = bestimmte Verdünnungsstufe des Virus im HA Test [log HA/100 µL].

Tissue Culture Infectious Dose 50 ($TCID_{50}$) zur Bestimmung infektiöser Viruspartikel

Zur Bestimmung der infektiösen Viruspartikel wird der $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infectious Dose 50) verwendet, der die zellzerstörende Infektion von Viruspartikeln aufzeigt (Burleson et al., 1992). Mit einer Verdünnungsreihe von Viruslösung werden je 8 mit MDCK Zellen bewachsene Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gleichzeitig infiziert. Innerhalb der Inkubationszeit haben die Viren nach erfolgreicher Infektion der Zellen die Möglichkeit, sich bis zum Zeitpunkt des Abstoppens des Tests zu vermehren. Anschließend wird ein virusspezifischer Fluoreszenzantikörper zugegeben, der an die Viruspartikel adsorbiert und eine Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Der $TCID_{50}$ ist als die Verdünnungsstufe definiert, bei der gerade 50 % der Zellkulturen infiziert sind. Die Quantifizierungsgrenze beträgt 331 Viruspartikel/mL, der relative Standardfehler 56 % (Labormanual BPT). Eine Berechnung der infektiösen Viruspartikel erfolgt nach der Gleichung von Spearman und Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931, Gleichung 8):

$$\left(\log Virus\,100\,\%\right)+\left(0{,}5\right)-\frac{kumulativ\,100\%}{Anzahl\;Tests\;(pro\;Verdünnung)}=\log n\left[Virionen/100\;\mu L\right] \quad (8)$$

4.2.4 Bestimmung der infizierten Zellen auf Carriern

Zur Unterscheidung infizierter Zellen (I_C) von uninfizierten Zellen (U_C) wird ein Laser Scanning Mikroskop (LSM) verwendet. Dazu werden Proben von MDCK Zellen, die an Microcarrier geheftet sind, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) gewaschen und in Formaldehyd (2 % in PBS) bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen werden nochmals mit PBS und Glyzerin (2 % in PBS) gewaschen und anschließend mit Digitonin (6 bis 12 µg/mL) perforiert. Anschließend werden sie mit Rinderserum Albumin (BSA, 1 %) in PBS gewaschen und anschließend mit einem 1:100 verdünnten polyklo-

nalen Antiserum (Schaf) gegen Pferde-Influenza Newmarket 1/93 (N3H8) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS werden die Zellen mit einem sekundären fluoreszenzkonjugierten Antikörper gegen Schaf (Alexa 488) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Auszählung der Zellen auf den Microcarriern werden Bilder mit einem LSM 510 (Anregung 488 nm) aufgenommen. Die infizierten Zellen fluoreszieren in grüner Farbe (Emission 543 nm) während die nicht infizierten Zellen dunkel bleiben.

4.3 Software

Die für beide Modellteile entwickelten nichtlinearen Gleichungssysteme werden zunächst in MATLAB (Version 7, Release 13) (Beucher & Ottmar, 2002; Biran & Breimer, 1997; Sigmon & Kermit, 1993; Überhuber et al., 2005) gelöst. Zur Lösung der Delay Differential Equations im zweiten Modellteil wird die Berechnung mit ProMot bzw. DIVA (Tränkle et al., 1997; Köhler et al., 1997; Marquardt & Wolfgang, 1992; Marquardt et al., 1993; Holl et al., 1988; Körner et al., 1990) durchgeführt.

5 Wachstum und Stoffwechsel von MDCK Zellen auf Microcarriern

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Mathematisches Modell

Das mathematische Modell zum ersten Prozessschritt soll die Schätzung der Zellzahl als auch des Verbrauchs der Substrate Glucose und Glutamin und der Produktion der Inhibitoren Lactat und Ammonium ermöglichen. Ebenfalls soll eine Beschreibung der Verzögerungszeit zwischen Einsaat bis zum Beginn des Wachstums der Zellen in das Modell eingehen. Diese Verzögerungszeit entsteht wie eingangs beschrieben durch das Anheften der Zellen an die Microcarrier und das Abflachen der Zellen bis zur möglichen Teilung. Dazu werden drei unterschiedliche Ansätze aufgestellt und miteinander verglichen: (a) Bestimmung der Lag-Phase und zeitliche Verschiebung des Datensatzes (Shift Modell), um die Simulationsergebnisse auf die experimentellen Daten abbilden zu können, (b) Nachbildung der Lagphase durch einen logistischen Ansatz (logistisches Modell) und (c) Anpassung mittels eines segregierten Modells, das die Zellpopulation in lebende Zellen in Suspension, lebende Zellen auf Microcarriern, tote Zellen in Suspension und lysierte Zellen aufteilt (Attachment Modell). Die Betrachtung der genannten Modellvarianten wird jeweils an demselben Datensatz einer Fermentation (F56) vorgenommen. Der Parametersatz des Attachment Modells wird an zwei weitere Datensätzen (F70 und F86) angepasst.

Zur Modellierung gehen oben genannte Substrate und die beiden Inhibitoren in die Bilanzgleichungen ein. Alle anderen Medienkomponenten werden als ausreichend im Wachstumsmedium vorhanden und nicht inhibierend vorausgesetzt.

Im Folgenden werden die Kinetiken präsentiert. Die Bilanzgleichungen finden sich bei der jeweiligen Modellbeschreibung. Zur Modellherleitung lassen sich

die Todesrate, sowie die Verbrauchs- und Produktbildungsraten wie folgt darstellen (nach Doyle & Griffith, 1998):

Todesrate k_{dead}

$$k_{dead} = k_d \left(\left(\frac{1}{1 + Glc/c_1} \right) + \left(\frac{1}{1 + Gln/c_2} \right) + k_{i,Lac} \cdot Lac + k_{i,Amn} \cdot Amn \right) \cdot X_V \qquad (9)$$

mit k_d = spez. Sterberate [h^{-1}], Glc = Glucosekonzentration [$\frac{mmol}{L}$], c_1 = glucosespezifischer Sterbekoeffizient [$\frac{mmol}{L}$], Gln = Glutaminkonzentration [$\frac{mmol}{L}$], c_2 = glutaminspezifischer Sterbekoeffizient [$\frac{mmol}{L}$], $k_{i,Lac}$ = lactatspezifischer Sterbekoeffizient [$\frac{L}{mmol}$], Lac = Lactatkonzentration [$\frac{mmol}{L}$], $k_{i,Amn}$ = ammoniumspezifischer Sterbekoeffizient [$\frac{L}{mmol}$], Amn = Ammoniumkonzentration [$\frac{mmol}{L}$].

Unter der Annahme, dass ein Mangel an Glucose und Glutamin die Sterblichkeit der Zellen nicht erhöht, sondern die Sterberate, unabhängig vom Substrat, nur durch hohe Konzentrationen der Inhibitoren beeinflusst wird (Dalili et al., 1990), wird Gl (9) umgeschrieben zu

$$k_{dead} = k_d \left(1 + k_{i,Lac} \cdot Lac + k_{i,Amn} \cdot Amn\right) \cdot X_V \qquad (10)$$

Verbrauchsrate für Glucose r_{Glc}

$$r_{Glc} = \left(\frac{1}{Y_{X,Glc}} \cdot \mu + m_{Glc} \right) \cdot X_V \qquad (11)$$

mit $Y_{X,Glc}$ = glucosespezifischer Ausbeutekoeffizient [$\frac{Zellen}{mmol}$], μ = spez. Wachstumsrate [h^{-1}], m_{Glc} = glucosespezifischer Zellerhaltungskoeffizient [$\frac{mmol}{Zelle \cdot h}$]

Verbrauchsrate für Glutamin r_{Gln}

$$r_{Gln} = \left(\frac{1}{Y_{X,Gln}} \cdot \mu + m_{Gln} \right) \cdot X_V \qquad (12)$$

mit $Y_{X,Gln}$ = glutaminspezifischer Ausbeutekoeffizient [$\frac{Zellen}{mmol}$], m_{Gln} = glutaminspezifischer Zellerhaltungskoeffizient [$\frac{mmol}{Zelle \cdot h}$]

Produktbildungsrate für Lactat r_{Lac}

$$r_{Lac} = \alpha_{Lac} \cdot \mu \cdot X_V \tag{13}$$

mit α_{Lac} = zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Lactat [$\frac{mmol}{Zelle}$]

Produktbildungsrate für Ammonium r_{Amn}

$$r_{Amn} = \alpha_{Amn} \cdot \mu \cdot X_V \tag{14}$$

mit α_{Amn} = zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Ammonium [$\frac{mmol}{Zelle}$]

Spezifische Wachstumsrate μ

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \tag{15}$$

Mit μ_{max} = maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}], S = Konzentration des limitierenden Substrates [$\frac{mmol}{L}$], K_S = substratspezifische Monod-Konstante [$\frac{mmol}{L}$]

Die typische biologische Beschreibung der Wachstumslimitierung durch ein Substrat ist die Monod-Kinetik (Monod, 1942). Davon ausgehend, dass eine Enzymreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bildet, lässt sich die Enzymkinetik, wie sie 1913 von Michaelis und Menten eingeführt wurde, auf das Zellwachstum übertragen. Die Gleichung beinhaltet zwei biologisch interpretierbare Parameter, die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} des Organismus und den Substrateinfluss auf das Zellwachstum K_S. Der substratspezifische K_S-Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der das maximale Zellwachstum halbiert wird. Im Gegensatz zur Michaelis-Menten-Konstante K_m, die sich auf eine spezifische Enzymreaktion bezieht, handelt es sich bei der Monod-Konstante um einen empirischen Parameter, der den mittleren Substrateinfluss auf alle zellulären Reaktionswege beschreibt.

Sind mehrere Substrate wie für den betrachteten Fall limitierend, führt dies zu komplexen Interaktionen, die mit einem unstrukturierten Modell nur unzureichend nachgebildet werden können, sofern nicht eine Vielzahl von anzupassenden Parametern eingeführt wird (Nielsen, 2003). Tsao und Hansen (1975)

schlagen einen generellen Ansatz zur Berücksichtigung des Wachstums auf mehreren Substraten, die limitierend wirken können, und gleichzeitig wachstumsverstärkenden (enhancing) Komponenten, vor.

$$\mu = \left(1 + \sum_i \frac{S_{e,i}}{S_{e,i} + K_{e,i}}\right) \prod_j \frac{\mu_{\max,j} S_j}{S_j + K_{s,j}} \tag{16}$$

mit $\sum_i$ = Summe über alle wachstumsverstärkenden Komponenten, S_e = Konzentration des wachstumsverstärkenden Substrates $[\frac{mmol}{L}]$, $\prod_j$ = Produkt aller limitierenden Komponenten.

Für eine doppelte Substratlimitierung, wie in unserem Beispiel Glucose und Glutamin, ergibt sich die Multiplikation zweier Einsubstratkinetiken

$$\mu = \mu_{\max,1} \frac{S_1}{S_1 + K_{s,1}} \cdot \mu_{\max,2} \frac{S_2}{S_2 + K_{s,2}} \tag{17}$$

die jedoch insofern nicht treffend scheint, als eine angenommene Einschränkung der spezifischen Wachstumsrate durch jeweils beide Substrate auf 90 % des maximalen Wachstums zu einer Reduktion der Gesamtrate auf 81 % führt. Basierend auf „Liebigs Gesetz des Minimums“ wurde von Roels (1983) der Ansatz

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \min\left(\frac{S_1}{S_1 + K_{s,1}}, \frac{S_2}{S_2 + K_{s,2}}\right) \tag{18}$$

für Zellkulturen verwendet. Dieses Gesetz ist eine Standardformulierung in zahlreichen Modellen konkurrierender Spezies auf zwei sich ergänzenden oder ersetzbaren Substraten (Hsu et al., 1981; Leon & Tumpson, 1975). Dieser Zusammenhang führt zu einer Reduktion der Gesamtrate des oben genannten Beispiels auf 90 %.

Für die im Weiteren beschriebenen Modellbetrachtungen wird die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ unter Berücksichtigung zweier limitierender

Substrate (Glucose und Glutamin) und zweier Inhibitoren (Lactat und Ammonium) wie folgt vorgenommen:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \min\left(\frac{Glc}{Glc + K_{Glc}}, \frac{Gln}{Gln + K_{Gln}}\right) \cdot \frac{K_{Lac}}{Lac + K_{Lac}} \cdot \frac{K_{Amn}}{Amn + K_{Amn}} \qquad (19)$$

mit K_{Glc} = glucosespezifische Monod-Konstante [$\frac{mmol}{L}$]; K_{Gln} = glutaminspezifische Monod-Konstante [$\frac{mmol}{L}$]; K_{Lac} = lactatspezifische Inhibitor-Konstante [$\frac{mmol}{L}$]; K_{Amn} = ammoniumspezifische Inhibitor-Konstante [$\frac{mmol}{L}$]

Für das betrachtete Zellwachstum auf Microcarriern wird die spezifische Wachstumsrate nicht nur durch die limitierenden Substrate und Inhibitoren, sondern auch durch den verfügbaren Platz auf den Carriern eingeschränkt. Typischerweise wird dazu der Zusammenhang

$$\frac{1}{X_{\max}}(X_{\max} - X) \qquad (20)$$

mit X_{max} = maximale Zellkonzentration auf Microcarriern [$\frac{Zellen}{mL}$], X = tatsächliche Zellkonzentration auf Microcarriern [$\frac{Zellen}{mL}$]

(M´Kendrick & Pai, 1911) angewendet, die für eine lineare Abnahme der spezifischen Wachstumsrate sorgt (vergl. Seber & Wild, 1989). Dieser Term sorgt für einen graduellen Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase, was typischerweise in den experimentellen Wachstumskurven adhärenter Zellen beobachtet werden kann (Frame & Hu, 1988).

5.1.1.1 Shift Modell (a)

Das erste Modell besteht aus 5 gewöhnlichen Differenzialgleichungen mit 16 Parametern zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs von Zellzahlen, Glucose, Glutamin, Lactat und Ammonium. Eine modellhafte Beschreibung der Lagphase wird nicht vorgenommen, jedoch wurden die experimentellen Daten zur Parameterbestimmung um 8 h verschoben. Dazu wurde aus dem Datensatz der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Anzahl lebender Zellen nicht mehr ab-

nimmt, sondern stetig zunimmt. Ausgehend davon, dass nicht alle Einsaatzellen auf den Microcarriern anheften, was in dem zeitlichen Verlauf der Lebendzellzahl experimenteller Daten beobachtet werden kann, wird die Startzellzahl, auf einen Wert von 80 % des Inokulums korrigiert (vergl. Yokomizo et al., 2004; Pereira et al., 2004). Angaben zur Abschätzung der Parameter finden sich im folgenden Kapitel. Die spezifische Wachstumsrate ergibt sich aus den Gleichungen (19) und (20)

$$\mu_I = \mu_{\max} \min\left(\frac{Glc}{K_{Glc}+Glc}, \frac{Gln}{K_{Gln}+Gln}\right) \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} \frac{X_{\max}-X}{X_{\max}} \qquad (21)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_I \cdot X - k_d (1 + k_{i,lac} \cdot Lac + k_{i,anm} \cdot Amn) X \qquad (22)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/Glc}} \mu_{\max} \frac{X_{\max}-X}{X_{\max}} \frac{Glc}{K_{Glc}+Glc} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} X - m_{Glc} \cdot \sigma(Glc) \cdot X \qquad (23)$$

$$\frac{dGln}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/Gln}} \mu_{\max} \frac{X_{\max}-X}{X_{\max}} \frac{Gln}{K_{Gln}+Gln} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} X - k_{dQ} Gln - m_{Gln} \cdot \sigma(Gln) \cdot X \qquad (24)$$

$$\frac{dLac}{dt} = \alpha_{Lac} \cdot \mu_I \cdot X \qquad (25)$$

$$\frac{dAmn}{dt} = \alpha_{Amn} \cdot \mu_I \cdot X + k_{dQ} Gln \qquad (26)$$

mit K_{dQ} = glutaminspezifischer Zerfallskoeffizient [h^{-1}] und einer Sättigungsfunktion $\sigma(S)$, die im Modell als Sprungantwort $\sigma(S) = \begin{cases} 1 \text{ für S} > 0 \\ 0 \text{ für S} = 0 \end{cases}$ implementiert wird (vergl. Anhang, Kapitel A2).

5.1.1.2 Logistisches Modell (b)

Für den zweiten Modellansatz wird die spezifische Wachstumsrate (Gl. 21) um einen Exponentialterm, der zu einer Verzögerung des Wachstums führt, erweitert

$$\mu_{II} = \mu_{\max} \min\left(\frac{Glc}{K_{Glc}+Glc}, \frac{Gln}{K_{Gln}+Gln}\right) \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} \frac{X_{\max}-X}{X_{\max}} \cdot \left(1 - e^{-t/\tau}\right) \qquad (27)$$

und diese Ergänzung auch entsprechend in den Gleichungen der Substrate und Inhibitoren vorgenommen. Die Simulation des zweiten Modells beginnt zum Zeitpunkt t = 0 h mit dem korrigiertem Anfangswert der Zellzahl von $0{,}8 \cdot X$.

5.1.1.3 Attachment Modell (c)

Das dritte Modell wird zunächst anhand Abbildung 9 vorgestellt.

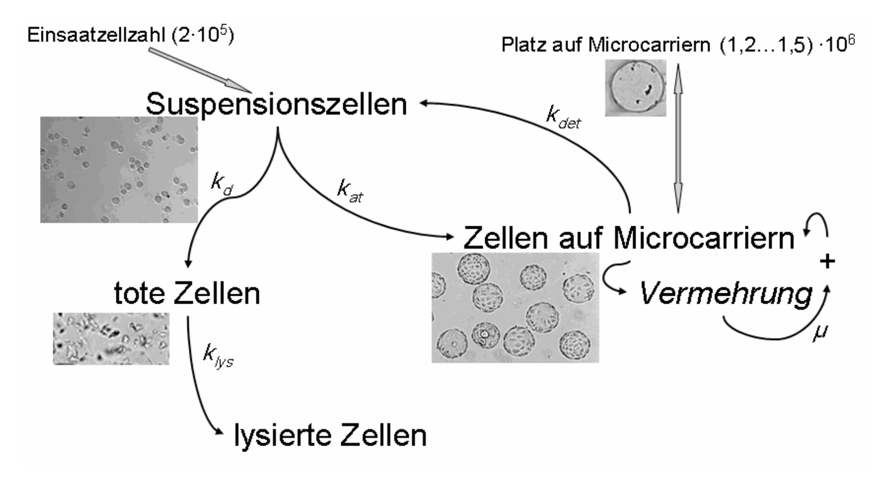

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Attachment Modells. Ein Inokulum von $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL wird unter Kontrolle von Temperatur, pH-Wert, Rührerdrehzahl in einem Microcarriersystem bis zur Konfluenz auf $(1{,}2$ bis $1{,}5) \cdot 10^6$ Zellen/mL kultiviert.

Die in Suspension gegebenen Zellen heften mit einer Rate k_{at} an die freien Microcarrier an. Nur hier findet Zellwachstum statt. In der Suspension verbleibende Zellen sterben mit einer Rate k_d ab und lysieren anschließend mit k_{lys}. Zellen auf den Microcarriern sterben nicht direkt. Nur Zellen, die von den Carriern mit einer Rate k_{det} wieder in Suspension gelangt sind, was im realen Prozess von den Fermentationsbedingungen abhängt (Rührereinfluss, Schädigung durch Trypsin, etc.), folgen von neuem den oben genannten Möglichkeiten und docken entweder erneut an einen Microcarrier oder sterben ab.

Zur Modellformulierung wird die Population der Zellen in lebende Zellen in Suspension (X_{sus}) und vitale, sich teilende Zellen auf dem Microcarrier (X_{MC}) unterschieden (segregierter Modellansatz), was in folgenden Gleichungen ausgedrückt wird:

$$\mu_{III} = \mu_{\max} \min\left(\frac{Glc}{K_{Glc}+Glc}, \frac{Gln}{K_{Gln}+Gln}\right) \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} \frac{X_{\max}-X_{MC}}{X_{\max}} \quad (28)$$

$$\frac{dX_{sus}}{dt} = -k_{at} \frac{X_{\max}-X_{MC}}{X_{\max}} X_{sus} + k_{\det} X_{MC} - k_d \left(1 + k_{i,lac} \cdot Lac + k_{i,anm} \cdot Amn\right) X_{sus} \quad (29)$$

$$\frac{dX_{MC}}{dt} = \mu_{III} \cdot X_{MC} + k_{at} \frac{X_{\max}-X_{MC}}{X_{\max}} X_{sus} - k_{\det} X_{MC} \quad (30)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/Glc}} \mu_{\max} \frac{X_{\max}-X_{MC}}{X_{\max}} \frac{Glc}{K_{Glc}+Glc} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} X_{MC} - m_{Glc} \cdot \sigma(Glc) \cdot X_V \quad (31)$$

$$\frac{dGln}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/Gln}} \mu_{\max} \frac{X_{\max}-X_{MC}}{X_{\max}} \frac{Gln}{K_{Gln}+Gln} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac}+Lac} \frac{K_{Amn}}{K_{Amn}+Amn} X_{MC} - k_{dQ} Gln - m_{Gln} \cdot \sigma(Gln) \cdot X_V \quad (32)$$

$$\frac{dLac}{dt} = \alpha_{Lac} \cdot \mu_{III} \cdot X_{MC} \quad (33)$$

$$\frac{dAmn}{dt} = \alpha_{Amn} \cdot \mu_{III} \cdot X_{MC} + k_{dQ} Gln \quad (34)$$

mit $X_V = X_{MC} + X_{sus}$.

Die Lebendzellzahl (X_v) setzt sich zusammen aus lebenden Zellen auf den Microcarriern (X_{MC}) und lebenden Zellen in Suspension (X_{Sus}). Tote Zellen in Suspension (X_d) sind nicht stabil im Bioreaktor und gehen in Lyse über. Die toten Zellen in Suspension (X_d) und die lysierten Zellen (X_{lys}) lassen sich berechnen durch

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d \left(1 + k_{i,lac} \cdot Lac + k_{i,anm} \cdot Amn\right) \cdot X_{sus} - k_{lys} X_d \quad (35)$$

$$\frac{dX_{lys}}{dt} = k_{lys} X_d \quad (36)$$

Für alle Modelle des Wachstums der MDCK-Zellen werden folgende Annahmen getroffen:

- Die Zellteilung beginnt nach dem Anheften auf dem Microcarrier und dem Abflachen der Zellen.
- An den Microcarrier angeheftete Zellen vermehren sich und breiten sich auf dem Microcarrier solange aus, bis sie die gesamte Oberfläche bedecken.
- Für das Zellwachstum limitierende Metabolite sind Glucose und Glutamin, Lactat und Ammonium inhibieren das Wachstum. Alle weiteren Metabolite sowie die Versorgung mit Sauerstoff werden als ausreichend angenommen.
- Die Substrate Glucose und Glutamin liegen nicht in wachstumshemmenden oder zellschädigenden Konzentrationen vor.
- Zusätzlich zum Zellmetabolismus verringert sich die Glutaminkonzentration durch Zerfall zu Ammonium.
- Die spezifische Wachstumsrate ist durch das Minimum der Monod-Kintetiken von Glucose und Glutamin und durch eine „doppelte" Inhibierung von Lactat und Ammonium bestimmt.
- Als zusätzliche Wachstumslimitierung wird der auf den Microcarriern zur Verfügung stehende Platz angenommen.
- Das Zellwachstum endet mit kompletter Bedeckung der Oberfläche der Microcarrier, da die Zellen nicht in einer zweiten oder dritten Schicht wachsen; in diesem Stadium werden nur noch Funktionen des Erhaltungsstoffwechsels (m_{Glc}, m_{Gln}) vollzogen.

5.1.1.4 Parameterbestimmung für alle Modellvarianten

Die zur Modellierung notwendigen Parameter wurden nach Möglichkeit anhand eigener Experimente bestimmt. Die Werte wurden mit denen für andere Zellsysteme (Literatur) verglichen. War eine Durchführung eigener Untersuchungen nicht möglich oder konnte aus den Experimenten kein verwertbarer

Wert ermittelt werden, wurde auf Angaben anderer Forschergruppen zurückgegriffen.

Startwerte für die Modellparameter wurden anhand der vorliegenden Fermentationsdaten zahlreicher Kultivierungen der Arbeitsgruppe, aus Einzelexperimenten oder durch Vergleich mit anderen Zelllinien abgeschätzt. Die Glutaminstabilität wurde in eigenen Experimenten mit dem Ansatz einer Zerfallskinetik erster Ordnung zu 0,0036 h^{-1} bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,3 bestimmt (Anhang 3). Auf der Grundlage von Einzelexperimenten wurde die Attachmentrate zu k_{at} = 0,12 h^{-1} abgeschätzt. Der Mittelwert der Detachmentrate wurde zu k_{det} = 0,036 h^{-1} bestimmt. Die mittlere Todesrate der in Suspension befindlichen Zellen beträgt k_d = 0,07 h^{-1}, die mittlere Lyserate k_{lys} = 0,35 h^{-1}. Die Experimente werden von Bock (Promotionsschrift, in Vorbereitung) veröffentlicht. Eine Übersicht der durchgeführten Versuche befindet sich im Anhang (A4). Der Wert der maximalen Wachstumsrate von μ_{max} = 0,046 h^{-1} wurde aus der Abschätzung der Wachstumsraten der Fermentationen F56, F70 und F86 und Mittelwertbildung gewonnen (Anhang 5). Die Monod-Konstanten für Glucose und Glutamin wurden aus den Untersuchungen von Cruz et al. (1999, BHK Zellen in DMEM) übernommen, die Konstanten für die Inhibierung durch Lactat und Ammonium nach Glacken et al. (1986, MDCK Zellen in DMEM, 1988 Hybridomazellen in DMEM) abgeschätzt. Der Zellerhaltungskoeffizient für Glucose wurde nach Miller (1988, Hybridoma) abgeschätzt. Der Zellerhaltungskoeffizient für Glutamin entstammt der Untersuchung von Glacken et al. (1986). Die Startwerte für die Produktionsraten der Inhibitoren entstammen der Untersuchung von CHO und Hybridomazellen von Biener (1998), die der Ausbeutekoeffizienten der Substrate wurden anhand der vorliegenden Veröffentlichungen und der Fermentationsdaten der Arbeitsgruppe sinnvoll abgeschätzt. Sämtliche Startparameter zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Doyle & Griffith (1998) veröffentlichten charakteristischen Werten für tierische Zellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Startparameter für MDCK Zellen und Literaturangaben für tierische Zelllinien. Grau unterlegt ist Quelle des Startwertes. Erläuterungen zu den Experimenten finden sich im Anhang (A4, A5).

Quelle	BPT Startwert	Quelle	Häggström 2000		Cruz 1999	Biener 1998		Doyle&Griffiths 1998	Linz 1997	Harigae 1994	Omasa 1992	Schmid 1992	Fernandez et al. 1988/1990	Glacken et al. 1988	Glacken et al. 1986	Miller 1988	Einheit
Zelle	MDCK		Hybridoma	Myeloma	BHK	CHO	Hybridoma	tierische Zellen	BHK	Hybridoma	Hybridoma	Hybridoma	AB2-143.2 Hybridoma	Hybridoma CRL 1606	MDCK	Hybridoma	
μ_{max}	0,046	Experiment				0,029	0,0504	0,02...0,125			0,0378	0,027…0,031		0,0582	0,055	0,062	h^{-1}
k_d	0,007	Experiment				0,003	0,007	0,008...0,08				0,0042…0,0071					h^{-1}
$Y_{X/Glc}$	0,1	Schätzung	0,3	1,7	0,1...0,2			0,0625...0,5	0,1...0,4	0,58		0,13				0,28	$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$
$Y_{X/Gln}$	1	Schätzung	0,5	1,4	0,4			0,33...1	0,6	0,344		0,2					$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$
K_{Glc}	0,4	Cruz 1999	0,2		0,4	0,05	0,061	0,1...1								0,15	$\frac{mmol}{L}$
K_{Gln}	0,14	Cruz 1999	0,089		0,14	0,32	0,074	0,06...0,3							0,15	0,15	$\frac{mmol}{L}$
K_{Lac}	50	Glacken et al. 1988						8...12000			56		140	40...60		140	$\frac{mmol}{L}$
K_{Amn}	10	Glacken et al. 1986						1...45			5			3,7...14,1	10	20	$\frac{mmol}{L}$
m_{Glc}	0,5	Miller 1988						0,07...5		0,51						0,5	$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle h}$
m_{Gln}	0,4	Glacken et al. 1986						0,4		0,08					0,113…0,4		$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle h}$
$k_{i,Lac}$	-							0,01									$\frac{L}{mmol}$
$k_{i,Amn}$	-							0,03…0,05									$\frac{L}{mmol}$
α_{Lac}	2	Biener 1998				2,1	2,1	4…15									$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$
α_{Amn}	0,5	Biener 1998				0,51	0,51	1…3									$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$
k_{at}	0,12	Experiment															h^{-1}
k_{det}	0,016	Experiment															h^{-1}
k_{lys}	0,35	Experiment															h^{-1}

Zur Anpassung der Parameter an die experimentellen Werte wurde der Nelder-Mead-Simplex Algorithmus (Lagarias et al., 1998) in Matlab genutzt. Dazu wurde die Zielfunktion (Fehlerquadratsumme, FQS)

$$FQS = \left\| w(X - \overline{X}) \right\|_{Frob}^{2} = \sum_{i,j} \left[w\left(X - \overline{X}\right) \right]_{ij}^{2} \qquad (37)$$

Minimiert. Dabei sind $X = (X_1,...,X_i) \in \Re^{j \times i}$ die Simulationsergebnisse der Zustandsgrößen Zellzahlen (X für das Shift- und logistische Modell, X_{MC} und X_{sus} für das Attachment Modell), Glucose, Glutamin, Lactat und Ammonium, $\overline{X}$ die Messwerte der experimentellen Daten, i die Anzahl der Datenpunkte und j die Anzahl der betrachteten Zustände. Die Gewichtungsmatrix $w_{ij} = diag(w_1,...,w_j), w_i > 0$ korrigiert den Einfluss unterschiedlicher Dimensionen der Zustände. Die Elemente der Gewichtungsmatrix ergeben sich aus dem Kehrwert des Maximums des jeweiligen Zustandes. Beim Attachment Modell wurde keine Anpassung an tote Zellen vorgenommen.

Für jede Fermentation wurde ein individueller Parametersatz angepasst. Aus den experimentellen Daten sind unterschiedliche Lagzeiten bis zu Beginn des Wachstums sichtbar, ebenso zeigen sich unterschiedliche Ausbeuteraten und Produktionsraten der Metabolite. Für die Zelllinie spezifische Parameter wie die Monodkonstanten, die Todesrate und die Lyserate werden als fest angenommen und nicht optimiert.

Wie in Tabelle 4 erkennbar, wurden zellspezifische Parameter wie die inhibitorischen und limitierenden Koeffizienten (K_{glc}, K_{gln}, K_{lac}, K_{amn}), die Rate von Zelltod als auch Lyse (k_d, k_{lys}) als invariante Zelleigenschaft und der autokatalytische Zerfall von Glutamin (k_{dQ}) als chemische Eigenschaft und ebenfalls invariant gewertet. Je nach Umgebungsbedingungen sind die Parameter wie die maximale spezifische Wachstumsrate, Attachment- und Detachmentrate (μ_{max}, k_{at}, k_{det}), die Ausbeute- bzw. Produktbildungskoeffizienten (Y_{glc}, Y_{gln}, α_{Lac}, α_{Amn}) und die Parameter für den Erhaltungsstoffwechsel (m_{Glc}, m_{Gln})

jedoch veränderlich und wurden für die verschiedenen Fermentationen optimiert. Ein Vergleich des Mittelwertes der Parametersätze des Attachment Modells mit den Modellbeschreibungen anderer Arbeitsgruppen finden sich im Anhang (A6).

Tabelle 4: Vollständiger Parametersatz des Shift Modells (a), des Logistischen Modells (b) und des Attachment Modells (c), Parameteroptimierung für (a), (b) an den Datensatz der Fermentationen F56, für (c) an F56, F70, F86.

	(a)	(b)	(c)			Einheit
	F56			F70	F86	
Y_{glc}	0,04	39,2	0,05	0,77	0,07	$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$
Y_{gln}	3,60	1,79	1,02	5,45	0,79	$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$
K_{glc}	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	$\frac{mmol}{L}$
K_{gln}	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	$\frac{mmol}{L}$
K_{lac}	50	50	50	50	50	$\frac{mmol}{L}$
K_{amn}	10	10	10	10	10	$\frac{mmol}{L}$
α_{Lac}	34,30	35,80	28,40	14,10	30,20	$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$
α_{Amn}	1,16	1,20	0,95	0,48	0,67	$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$
k_{dQ}	0,0036	0,0036	0,0036	0,0036	0,0036	h^{-1}
μ_{max}	0,0282	0,0265	0,0509	0,1096	0,0567	h^{-1}
k_d	$1{,}18 \cdot 10^{-7}$	$9{,}33 \cdot 10^{-7}$	0,07	0,07	0,07	h^{-1}
k_{at}	-	-	0,0845	0,0083	0,0089	h^{-1}
k_{det}	-	-	0,0032	0,0015	0,0014	h^{-1}
k_{lys}	-	-	0,35	0,35	0,35	h^{-1}
$k_{i,Lac}$	25,8	0,34	8,95	1,02	1,05	$\frac{L}{mol}$
$k_{i,Amn}$	0,074	0,013	2,96	2,20	3,58	$\frac{L}{mol}$
m_{Glc}	0,09	0,01	0,05	2,16	1,04	$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle \cdot h}$
m_{Gln}	0,18	0,16	0,02	0,09	0,06	$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle \cdot h}$
X_{max}	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	$10^6 \frac{Zellen}{mL}$
τ	8	6	-	-	-	h
n	35	45	54	48	66	
p	10	11	11	11	11	
FQS	0,1378	0,1532	0,1329	0,3473	0,7661	

Jedes Modell wurde mit dem zugehörigen Parametersatz (Tabelle 4) simuliert und anschließend der Standardfehler unter Verwendung von Gleichung (38) berechnet

$$s_r = \sqrt{\frac{FQS}{n-p}} \quad . \tag{38}$$

Dabei sind n die Anzahl der experimentellen Daten und p die Anzahl der adaptierten Parameter. Die Werte der Standardfehler sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich der Restfehlerabweichung s_r für jede Modellbeschreibung, exemplarisch für die Fermentation F56.

Model Typ	Modellbeschreibung	Standardfehler s_r
Shift (a)	unstrukturiert, nicht-segregiert	0,074
Logistisch (b)	unstrukturiert, nicht-segregiert, mit Lag-Zeit	0,067
Attachment (c)	unstrukturiert, segregiert	0,056

5.1.2 Simulationsergebnisse

5.1.2.1 Shift Modell (a)

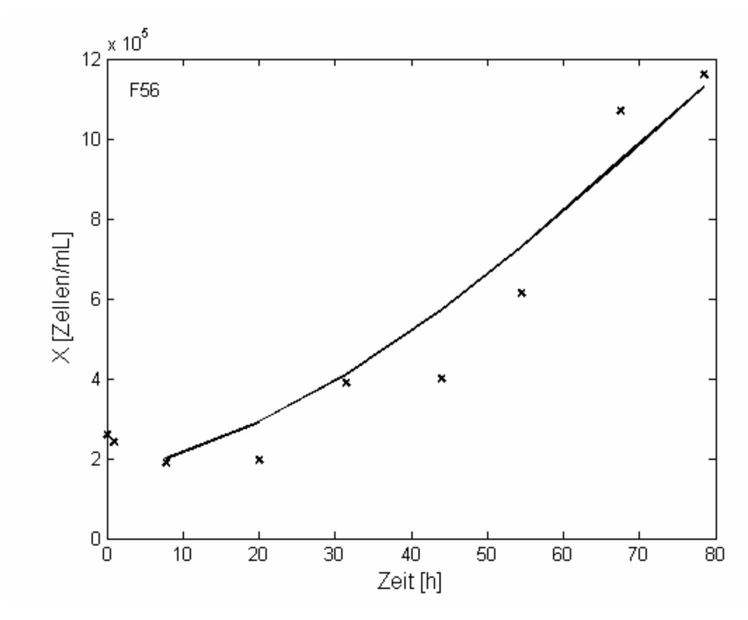

Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Zellzahl (*X*), (x) Messwerte und (—) Simulationsergebnis im Vergleich, Verschiebung der experimentellen Daten um 8 h.

Abbildung 10 zeigt die experimentellen Ergebnisse für den Verlauf der Zellzahlen im Vergleich mit der Simulation mit einem Startwert von 80 % der Zelleinsaat zum Zeitpunkt t = 8 h. Eine tendenziell gute Übereinstimmung der Messwerte und der Simulation ist sichtbar. Der Endwert zeigt eine gute Übereinstimmung von Simulation und experimentellen Daten. Im mittleren Intervall ist eine Streuung der Messdaten der Zellen erkennbar.

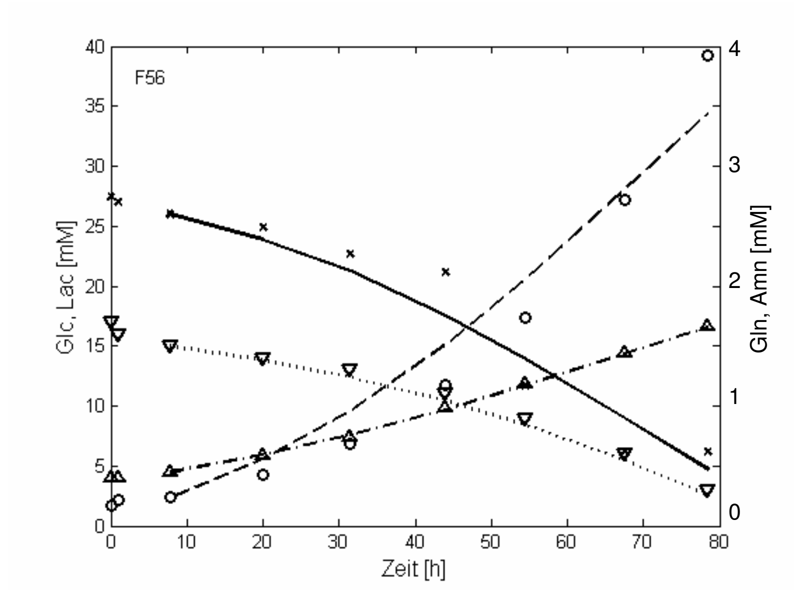

Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Substrate: Simulationsergebnisse für Glucose (—) und Glutamin (···), und Inhibitoren: Lactat (---) und Ammonium (·-·-·). Experimentelle Ergebnisse für Substrate: Glucose (x) und Glutamin (∇) und Inhibitoren: Lactat (o) und Ammonium (Δ).

Abbildung 11 zeigt den Verlauf der Substrate Glucose und Glutamin und der inhibitorisch wirkenden Produkte Lactat und Ammonium, für die experimentellen Daten und die Simulationsergebnisse. Wie in Abbildung 10 ist eine gute Übereinstimmung zwischen den Experimenten und den Simulationsergebnissen erkennbar. Die Simulationsergebnisse von Glutamin und Ammonium zeigen eine gute Übereinstimmung über das gesamte Prozessintervall. Bei Glucose ist eine zu hohe Verbrauchsrate in der Simulation ab etwa 20 h sichtbar. Entsprechend zu hoch ist die geschätzte Akkumulation von Lactat ab etwa 20 h. Die Endwerte werden jedoch gut geschätzt.

5.1.2.2 Logistisches Modell (b)

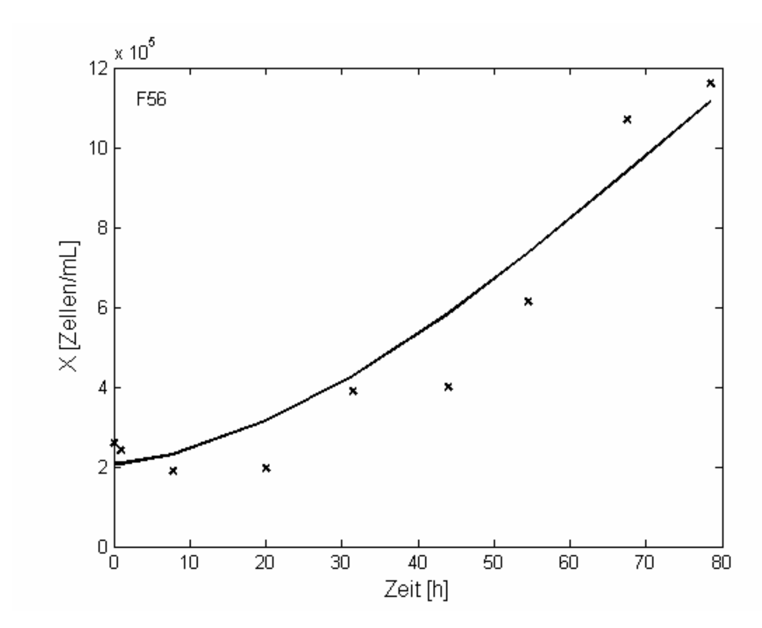

Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Zellzahl (X), (x) Messwerte und (—) Simulationsergebnis im Vergleich.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Zellzahl im Vergleich mit den Simulationsergebnissen. Der Startwert der Simulation für die Zellzahlen wird wiederum zu 80 % gewählt. Auch wenn die Simulation eine gute Voraussage des Endwertes treffen kann, wird der zwischenzeitliche Verlauf, speziell zwischen 8 bis 20 h und im Intervall von 45 bis 55 h der Zellzahlen überschätzt. Die sichtbare Abnahme der Zellen in den experimentellen Daten zu Beginn der Fermentation kann von der Simulation nicht wiedergegeben werden. Der Endwert der Simulation stimmt gut mit dem des Experiments überein.

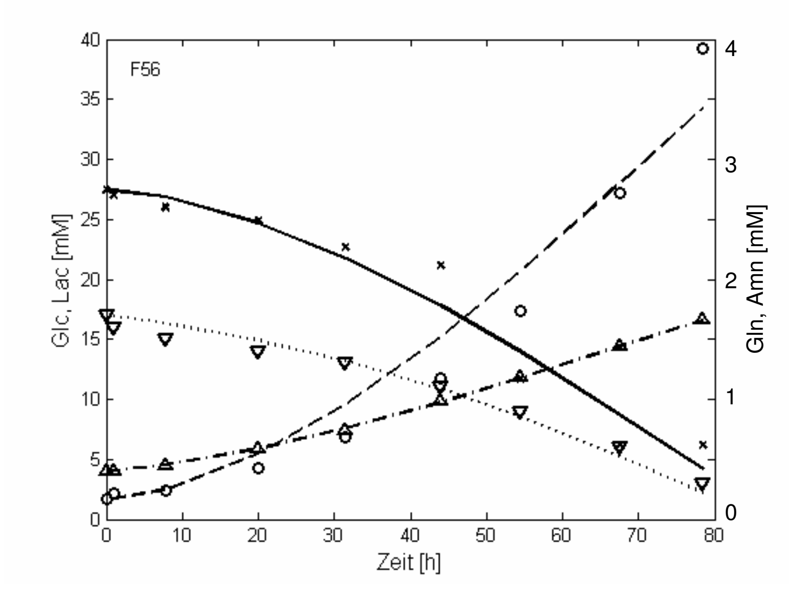

Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Konzentration der Substrate, Simulationsergebnisse für Glucose (—) und Glutamin (···), und der Inhibitoren: Lactat (---) und Ammonium (·-·-·) im Vergleich zu den experimentellen Daten: Glucose (x) und Glutamin (∇) und Inhibitoren: Lactat (o) und Ammonium (Δ).

Abbildung 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zu- bzw. Abnahme der Metabolitenkonzentrationen der experimentellen Daten und der Simulation. Es ist erkennbar, dass die Simulationsergebnisse des logistischen Modells den Verlauf der Messwerte der Substratkonzentrationen im Intervall 0 bis 8 h in guter Näherung wiedergeben können. Eine gute Übereinstimmung von Simulation und Messwerten der Konzentration von Glutamin und Ammonium kann ebenfalls festgestellt werden. In der zweiten Hälfte der Kultur ist die Verbrauchsrate der Glucose in der Simulation zu hoch, was zu einer zu hohen Produktionsrate von Lactat im gleichen Zeitraum führt. Die Endwerte werden, wie auch im ersten Modell, gut geschätzt.

5.1.2.3 Attachment Modell (c)

Abbildungen 14, a) – c) zeigen den Verlauf der neu eingeführten Zustandsvariablen X_{MC} im Vergleich zur Gesamtlebendzellzahl X_V. Wie eingangs erwähnt wurde der Parametersatz individuell an drei Kultivierungen, die unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen jedoch mit unterschiedlicher Startzellzahl durchgeführt wurden (F56, F70, F86), angepasst. Die Abnahme der Lebendzellzahl im Intervall von 0 bis 24 h wird gut vom Attachment Modell wiedergegeben. Dies war durch das Shift Modell und das logistische Modell nicht erklärt worden. Während für die ersten beiden Modelltypen (a) und (b) die Startzellzahl abgeschätzt werden musste, wird das Attachment Modell mit der experimentell bestimmten Einsaatzellzahl (F56: 2,6; F70, 3,0; F86; 1,4; [10^5 Zellen/mL]) gestartet. Bei hoher Startzellzahl zeigt sich eine schnelle Begrenzung durch die limitierende Oberfläche der Microcarrier (F70, etwa 70 h, $1{,}5\cdot10^6$ Zellen/mL), während bei niedriger Startzellzahl, wie zu erwarten, erst nach einer längeren Kulturzeit (F86, etwa 115 h) ein Wert von $1{,}4\cdot10^6$ Zellen/mL erreicht wird. Bei mittlerer Einsaatzellzahl wird nach einer Kulturzeit von 80 h eine Endzellzahl von $1{,}2\cdot10^6$ Zellen/mL erlangt. Eine Limitierung durch den Einfluss der Microcarrier ist in diesem Fall nicht sichtbar.

Abbildung 15 a) – c) zeigt den zeitlichen Verlauf der Lebendzellzahl in Suspension X_{Sus} und der toten Zellen X_d. Deutlich sichtbar ist – speziell für die toten Zellen – ein Rauschen der experimentellen Daten. Die Simulation zeigt eine Überseinstimmung des qualitativen Verlaufs mit den Messwerten. Die Suspensionszellen nehmen innerhalb von 20 h deutlich ab und verbleiben im restlichen Intervall auf einem niedrigen Wert von 1 bis $3\cdot10^4$ Zellen/mL. Für die toten Zellen kann zu Beginn der Fermentation ein Anstieg betrachtet werden, der im weiteren Verlauf etwas niedriger wird.

Abbildung 14, a - c): Zeitlicher Verlauf der Zustandsvariablen Zellen auf Microcarriern (X_{MC}): Simulationsergebnisse (···), experimentelle Daten (x); gesamte Lebendzellzahl (X_V): Simulationsergebnis (—), experimentelle Daten (o).

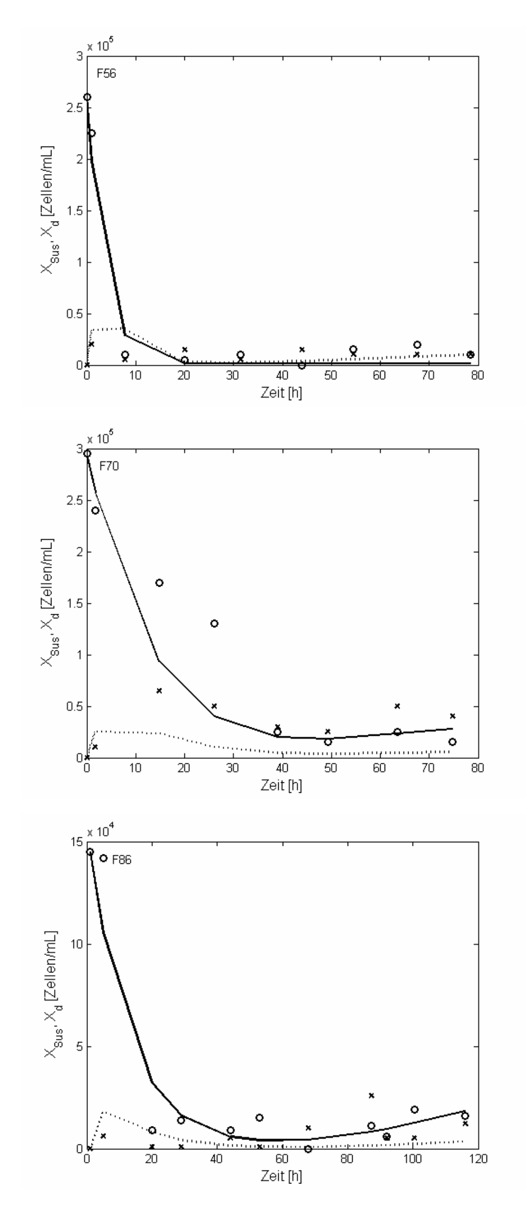

Abbildung 15, a) - c): Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahl in Suspension (X_{Sus}): Simulationsergebnisse (—), experimentelle Daten (o) und tote Zellen in Suspension (X_d): Simulationsergebnisse (···), experimentelle Daten (x).

Unter Berücksichtigung der Streuung der experimentellen Daten (30 % relative Standardabweichung für Zellzahlbestimmung bei F56 und F70, Abbildung 16 a) und b); 15 % relative Standardabweichung für Zellzahlbestimmung bei F86, Abbildung 16 c)) zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse der Lebendzellzahlen zum jeweiligen Experiment.

Abbildungen 17, a) – c) stellen den Verlauf der Messwerte und der Simulationsergebnisse der Konzentrationen aller Metabolite dar. Alle Simulationsergebnisse haben eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Es ist eine sehr gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den Messwerten für die Glucose-, Glutamin- und Ammoniumkonzentrationen im gesamten Prozessintervall sichtbar. Für Lactat zeigen sich Abweichungen der experimentellen Daten vom Simulationsergebnis bei der F56 und F70 im Intervall 30 bis 60 h. Die experimentellen Werte am Ende des Kulturintervalls können gut von der Simulation geschätzt werden. Bei allen Fermentationen werden gleiche Startkonzentrationen vorgegeben. Im Vergleich zu den Fermentationen F56 und F86 zeigt F70 einen deutlich geringere Substratverbrauchsrate, entsprechend sind die Produktionsraten für die Inhibitoren geringer. Die Substrate werden etwa zur Hälfte verbraucht (Rückgang der Glucosekonzentration von 28 mM auf 14 mM, der Glutaminkonzentration von 17 mM auf 8 mM). Im Vergleich dazu werden bei den Fermentationen F56 und F86 die Substrate fast vollständig verbraucht (jeweils Abnahme aller Konzentrationen auf 3 bis 6 mM). Lactat akkumuliert in der F70 vom Startwert 2 mM auf 30 mM, etwa 10 bis 15 mM weniger, als bei den Kultivierungen F56 und F86. Bei der Akkumulation von Ammonium ist kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kultivierungen sichtbar. Vom Startwert 5 mM akkumuliert die Konzentration aller Fermentationen auf Werte zwischen 13 bis 17 mM. In Abbildung 17, a) ist exemplarisch die Standardabweichung der Messmethode für die Metabolite angegeben.

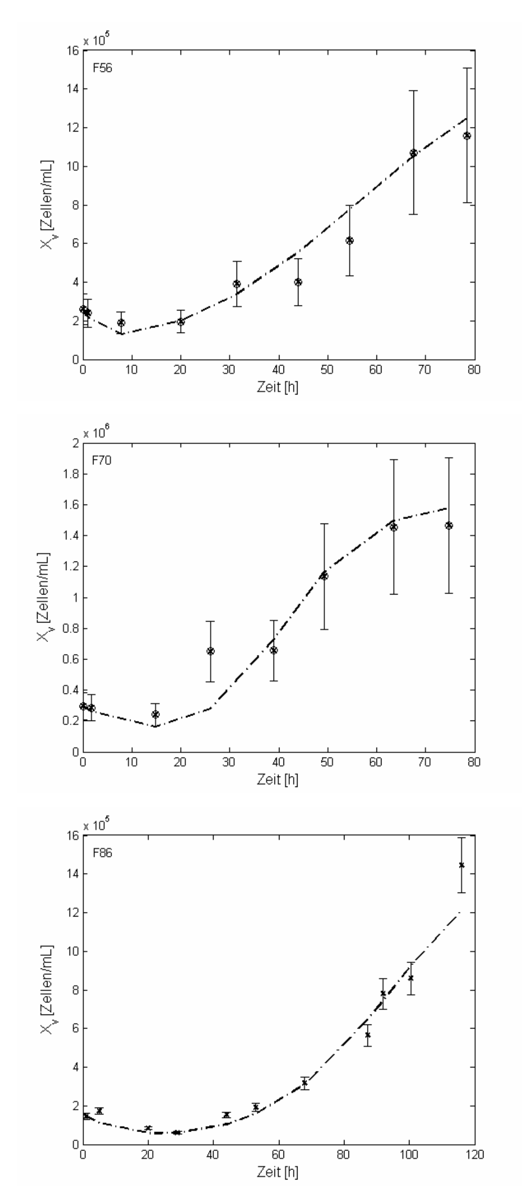

Abbildung 16, a) - c): Simulationsergebnisse der Lebendzellzahl und experimentelle Daten, relative Standardabweichung der lebenden Zellen 30 % (F56, F70) bzw. 15 % (F86). Simulationsergebnisse (·-·-·), experimentelle Daten (o).

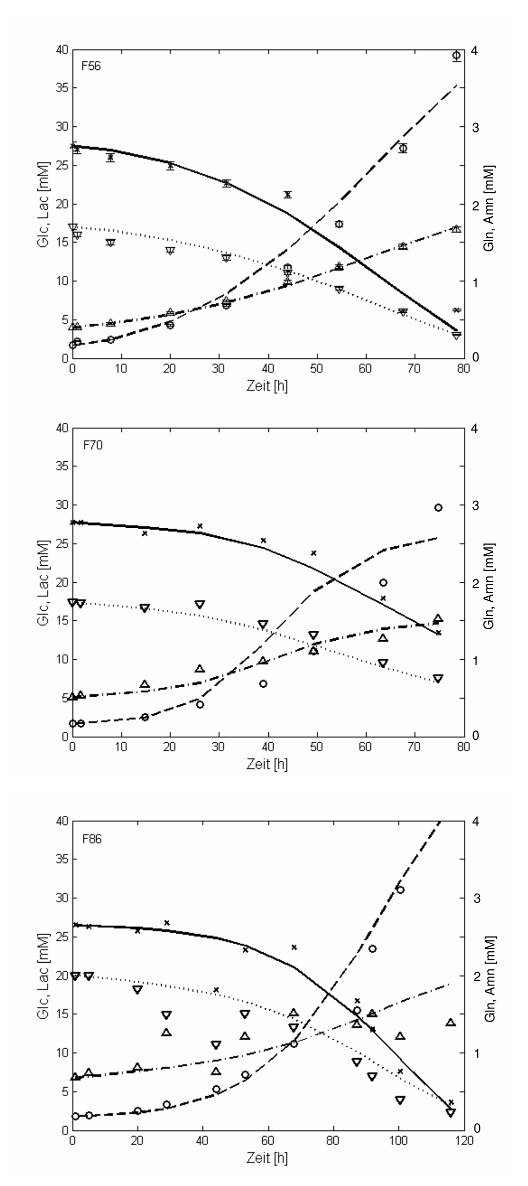

Abbildung 17, a) - c): Zeitlicher Verlauf der Substrate: Simulationsergebnisse für Glucose (—) und Glutamin (···), und Inhibitoren: Lactat (---) und Ammonium (·-·-·). Experimentelle Ergebnisse für Substrate: Glucose (x) und Glutamin (∇) und Inhibitoren: Lactat (o) und Ammonium (Δ); Standardabweichung der Messmethode bei F56 (I).

Abbildungen 18, a) – c) zeigen den Vergleich von lebenden Zellen (X_v), Zellen in Suspension (X_{Sus}) und toten Zellen (X_d). Erkennbar ist in den experimentellen Daten ein Rückgang der lebenden Zellen vom Zeitpunkt der Einsaat (0 h) bis zum Zeitpunkt t = 10 h (F56), 15 h (F70) bzw. 30 h (F86). Anschließend setzt das exponentielle Wachstum ein, das jedoch schnell durch den zur Verfügung stehenden Platz auf den Carriern begrenzt wird. Für die Simulationsergebnisse zeigt sich eine gute Übereinstimmung.

Ebenfalls ist in der Simulation ein Rückgang der lebenden Zellen sichtbar, im weiteren Verlauf setzt exponentielles Wachstum ein (bis zum Zeitpunkt t = 40 h (F56), 35 h (F70) und 70 h (F86)). Im restlichen Intervall findet lineares Wachstum statt, das zum Ende bei der F70 in die Limitierung durch den Platz auf den Microcarriern gerät (Bestimmung durch logarithmischen Auftrag von X_V über der Zeit, ohne Abbildung, vergleiche Abbildung 14). Für die experimentellen Werte der Zellen in Suspension zeigt sich für alle Fermentationen ein schneller Rückgang im Zeitintervall 0 bis 20 h auf einen Wert kleiner 1 bis $2{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/mL, der bis zum Ende der Prozesszeit keinen wesentlichen Änderungen unterliegt. Die Simulationsergebnisse bilden den Verlauf gut ab.

Bei der F56 und F86 zeigen die Verläufe der toten Zellen (Skalierung mit Faktor 10) nach einer deutlichen Zunahme nach der Einsaat (etwa 2 bis $6 \cdot 10^4$ Zellen/mL zum Zeitpunkt t = 2 h) starke Schwankungen im Bereich von 0,5 bis $2 \cdot 10^4$ Zellen/mL bis zum Ende des Prozesses. Im Vergleich dazu ist bei der F70 ein späterer Zeitpunkt des Maximalwerts toter Zellen sichtbar (etwa 15 h, $6 \cdot 10^5$ Zellen/mL). Im weiteren Verlauf schwankt die Anzahl toter Zellen um etwa $4 \cdot 10^5$ Zellen/mL. Der Simulationsverlauf weist größere Differenzen mit den experimentellen Daten auf: Der bis zum Zeitpunkt t = 2 h erkennbare Anstieg verzeichnet bei den Simulationen einen höheren Wert, der bis zum Zeitpunkt t = 10 h stabil bleibt. Danach geht die Zahl toter Zellen (t = 20 h; $0{,}4 \cdot 10^4$ Zellen/mL) zurück und steigt anschließend bis zum Ende des Simulationsintervalls in geringem Maße an (t = 80 h; $1{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/mL). Große Unter-

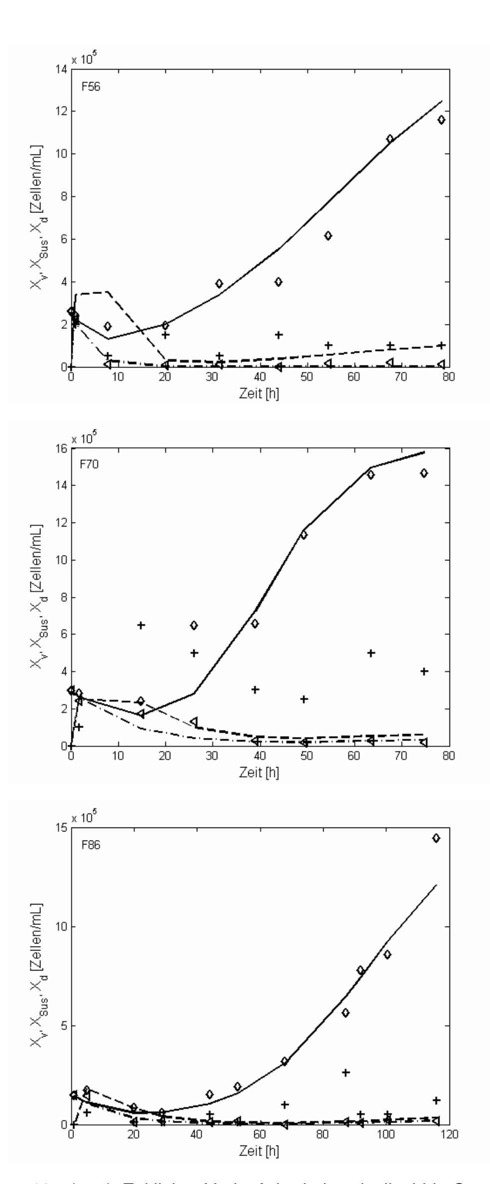

Abbildung 18, a) - c): Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahl in Suspension (X_{Sus}): Simulationsergebnisse (·-·-·), experimentelle Daten (◁), tote Zellen in Suspension 10 fach (X_d): Simulationsergebnisse (---), experimentelle Daten (+) und Gesamtlebendzellzahl (X_V) Simulationsergebnisse (—), experimentelle Daten (◊).

schiede zeigen sich im Intervall 10 bis 50 h. Die experimentellen Daten weisen ein starkes Rauschen auf und weichen somit vom Simulationsergebnis ab. Zum Ende des Prozessintervalls (70 bis 80 h) kann der Trend eines Ansteigens der toten Zellen im Experiment nicht beobachtet werden (Abbildung 18). Für die F70 und F86 werden die Anzahl der toten Zellen in der Simulation unterschätzt.

Abbildung 19 zeigt den Vergleich der Simulationsergebnisse der lebenden Zellen aller Modellbeschreibungen und der Messwerte der Lebendzellzahl für eine ausgewählte Kultivierung (F56). Unter Berücksichtigung der Streuung der Messwerte sind alle Modelle in der Lage, den Endwert der Zellkonzentration gut vorherzusagen. Innerhalb des Intervalls von 8 bis 80 h zeigt sich eine gute Übereinstimmung aller Modelle mit den experimentellen Daten. Das Attachment Modell gibt im Intervall 0 bis 30 h ein realistisches Bild der Lag- und Anheftungsphase wieder.

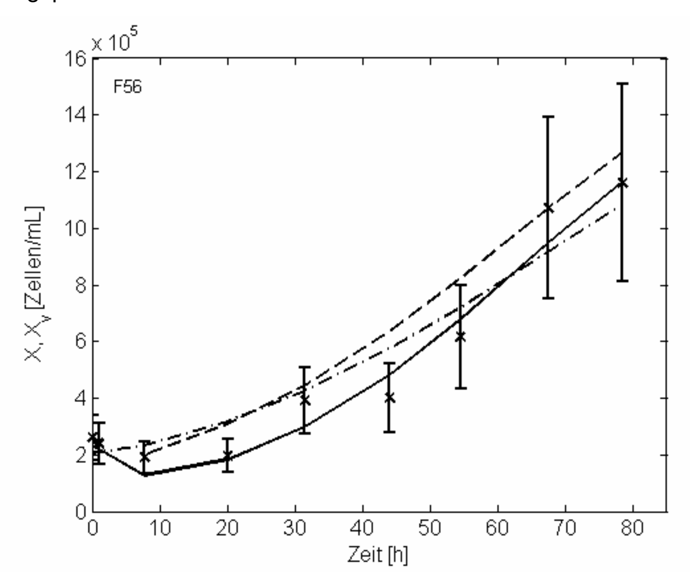

Abbildung 19: Simulationsergebnisse für Lebendzellzahlen aller Modellbeschreibungen (F56): (X) Shift Modell (---), logistisches Modell (·-·-·); (X_V) Attachment Modell (—).

5.1.2.4 Parametersensitivitäten

Es gibt zwei Hauptgründe, eine Sensitivitätsanalyse der Parameter durchzuführen. Zum einen kann es möglich sein, dass in einem entwickelten Modell nicht alle Parameter in Einzelexperimenten bestimmt werden können. In diesem Fall ist es hilfreich, zu wissen, ob die fehlenden Parameter mit hinreichender Genauigkeit durch Optimierung aus dem vorliegenden Datensatz bestimmt werden können. Zum anderen kann die Fragestellung sein, welche Parameter den größten Einfluss auf eine der Zustandsvariablen haben. Hier ist eine Kenntnis der einflussreichsten Parameterkombination von Interesse, die übertragen auf den realen Prozess für eine Ausbeutesteigerung sorgen kann.

Für unsere Betrachtung ist die Steigerung der Zellzahl und der Virusausbeute (Kapitel 5) wichtig. Herausgefunden werden sollen die Parameter der jeweiligen Modells, die auf das Maximum der jeweiligen Größe den Haupteinfluss zeigen. Dabei wird die lokale Sensitivität mit

$$\frac{dx}{dt} = f(x, \vec{p}, t) \tag{39}$$

berechnet. Durch Taylorreihenentwicklung und Abbruch nach dem ersten Term ergibt sich die Näherung

$$\Delta x \approx \frac{\delta x(t, p_j)}{\delta p_j} \cdot \Delta p_j \tag{40}$$

Die lokale Sensitivität erster Ordnung lässt sich annähernd durch

$$w(x, p_j) = \frac{\delta x(x, p_j)}{\delta p_j} \tag{41}$$

mit $x(x, p_j)$ als Variation von x bzgl. Änderung von p_j bestimmen (Majer, 1998).

Zur Untersuchung der Parametersensitivität des Attachment Modells wird jeder Parameter separat um 10 %, ausgehend vom in Tabelle 4 dargestellten Wert, ausgelenkt und die Abweichung des neuen Wertes der Zellzahl in Prozent der Zu- oder Abnahme vom ursprünglichen Wert angegeben.

Eine wichtige Frage ist, wie die Parameter des Attachment Modells, die den größten Einfluss auf die Zellzahl zum Endpunkt des Prozesses haben, den realen Prozess zur Erhöhung der Ausbeute beeinflussen können. Den größten Einfluss haben die Parameter μ_{max} und X_{max}, gefolgt von k_{at} und k_d (Abbildung 20). Eine Änderung von μ_{max} hat bei Erhöhung der Wachstumsrate um 10 % eine Ausbeutesteigerung von 3 % zur Folge, bei Verminderung um ebenfalls 10 % eine Verringerung um 5 %. Die Änderung von X_{max} um 10 % in positiver oder negativer Richtung ergibt eine Vergrößerung bzw. Verminderung der Ausbeute um etwa 9 %. Bei diesen beiden Parametern sind die größten Auswirkungen sichtbar.

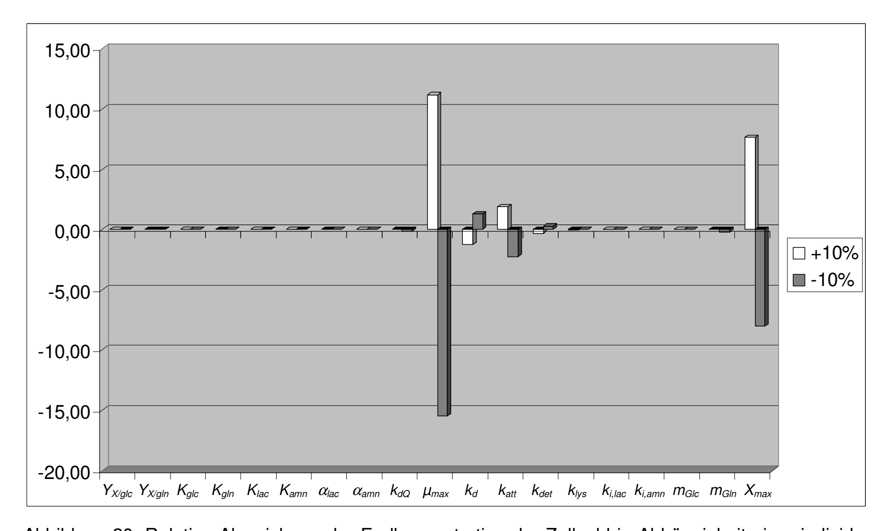

Abbildung 20: Relative Abweichung der Endkonzentration der Zellzahl in Abhängigkeit einer individuellen Auslenkung der optimierten Systemparameter um ± 10 %.

Unterhalb der Ein-Prozentmarke liegen die Parameter k_{at} und k_d, wobei die Sterberate den geringsten Einfluss der vier betrachteten Parameter hat und im Gegensatz zu den erstgenannten Parametern eine Vergrößerung des Parameterwertes zu einer Verringerung der Ausbeute führt und umgekehrt. Die Sensitivität der maximalen Zellzahl gegenüber allen anderen Parameter liegt unterhalb der Promillegrenze.

5.1.2.5 Untersuchung der Abweichung des Systems in den Parametern

Neben der Betrachtung, welchen Einfluss die Parameter auf das Simulationsergebnis eines Modells haben, ist ebenfalls von Interesse, welcher Anteil der Streuung des Simulationsergebnisses durch den relativen Fehler der Parameter erklärt werden kann. Von Fermentation zu Fermentation ergeben sich starke Schwankungen in der Ausbeute der Zellzahl, die nicht durch unterschiedliche Prozessbedingungen erklärt werden können, sondern eine andere Ursache, vermutlich biologischer Natur, aufweisen. Für das vorliegende Modellsystem wurde festgelegt, dass nur die Parameter biologischer Natur (μ_{max}, k_{at}, k_{det}, Y_{glc}, Y_{gln}, α_{Lac}, α_{Amn}, m_{Glc}, m_{Gln}, Kapitel 5.1.1.4) und außerdem die Startzellzahl ($X_{sus,0}$) einen Einfluss auf die Streuung des Simulationsergebnisses nehmen können. Die aus der Optimierung (Tabelle 3) erhaltenen Werte wurden einer statistischen Schwankung unterworfen (Normalverteilung, Sigma von 10 %) und jeweils eine Simulation durchgeführt (Stichprobengröße von n = 100). Anschließend wurde zum Zeitpunkt der erfassten Messwerte der Mittelwert und der relative Fehler der Simulationskurvenschar berechnet. Abbildung 21 a) – c) zeigt das Ergebnis anhand der für jede Fermentation gewonnenen Parametersätze.

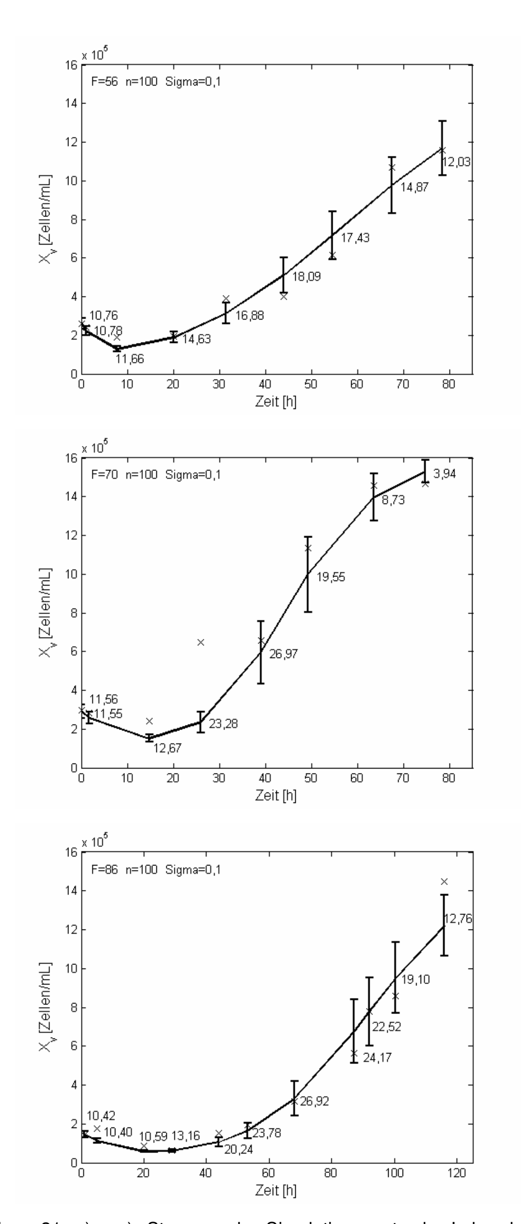

Abbildung 21, a) – c): Streuung der Simulationswerte der Lebendzellzahl (X_V) bei normalverteiltem Parametersatz, Mittelwert (—), Standardabweichung (⌶) vom Mittelwert (relativer Fehler, Zahlenangaben in Prozent).

Wie anhand des Mittelwerts und der Standardabweichung ersichtlich zeigt sich eine Zunahme der absoluten Streuung bis zum Ende des Versuchsablaufes. Für die prozentuale Abweichung ist ein Maximum in der Mitte des Prozessintervalls zu erkennen. Vom Zeitpunkt t = 0 steigt der relative Fehler von etwa 11 % bis zum Zeitpunkt t = 45 h (70 h; F86) bis auf 18 bzw. 27 % an und sinkt bis zum Ende des Simulationsintervalls wieder auf etwa 12 % (F56, F86) bzw. auf 4 % (F70) ab. Deutlich zeigt sich eine geringere Standardabweichung vom Mittelwert am Ende des Simulationsintervalls. Die Standardabweichung ist desto geringer, je weiter die Limitierung des Zellwachstums fortgeschritten ist (z.B. F70).

5.2 Diskussion

5.2.1 Mathematische Modellbildung des Wachstums und Stoffwechsels von adhärenten MDCK Zellen.

In diesem Teil der Arbeit wurden drei Modelle, die das Zellwachstum auf Microcarriern beschreiben, präsentiert. Alle Modelle berücksichtigen die Konzentrationen der das Zellwachstum beeinflussenden Stoffe, Glucose und Glutamin als limitierende Substrate und Lactat und Ammonium als Inhibitoren, um den zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Zellzahl zu beschreiben. Ebenfalls allen Modellen gemein ist die zusätzliche Wachstumslimitierung durch die zur Verfügung stehende Oberfläche auf den Microcarriern. Der Unterschied der Modellbeschreibungen liegt in der Einbindung der Verzögerung des Wachstums. Neben den neuen Umgebungsbedingungen nach der Einsaat aus der Vorkultur der Zellen in Rollerflaschen (Medienwechsel, leichte Temperaturschwankungen und Änderungen im pH-Wert) wird die Verzögerungszeit (Lagphase) bis zum Beginn des Wachstums der adhärenten Zellen hauptsächlich durch das Anheften der Zellen auf die Microcarrier und das zur Zellteilung notwendige Abflachen der Zellen verursacht. Eine Lagphase tritt auch bei Suspensionszellen auf, hat hier jedoch einen so geringen Einfluss, dass dieser Effekt im Wesentlichen in der Literatur nicht diskutiert wurde.

Das Shift Modell benötigt *a priori* Kenntnis über die Zeitverschiebung der Daten, die vorgenommen werden muss, um die Lagphase zu beschreiben, was von Fermentation zu Fermentation unterschiedlich ist. Weiterhin wird eine Annahme benötigt, wie viele der eingesäten Zellen innerhalb dieser Zeit tatsächlich an die Microcarrier anheften können. Ein Vergleich der gut bestimmten Zellzahl aus der Vorkultur zum Zeitpunkt $t = 0$ der Kultivierung mit der Zellzahl auf den Carriern zum subjektiv bestimmten Zeitpunkt, zu dem das Zellwachstum beginnt ($t = 8$ h, F56), lässt die Berechnung des Verhältnisses von angehefteten Zellen zur Einsaatzellzahl von 80 % zu. Untersuchungen

des Attachments von Verozellen an verschiedene Microcarrier (Yokomizo et al., 2004) zeigen unter vergleichbaren Startbedingungen ($1{,}34 \cdot 10^5$ Zellen/mL, 2 g/L Cytodex 1) ein schnelleres Attachment und eine höheres Verhältnis von Anheftungs- zu Einsaatzellzahl. Der Startwert des Shift Modells unterliegt der vagen Bestimmung der Lagphase und der prozentualen Abschätzung eines im Vergleich zur Einsaatzellzahl schlechter bestimmten Messwertes (hier $t = 8$ h).

Das logistische Modell benutzt einen Parameter τ im Sinne einer Antwortzeit, um den zeitlichen Versatz von der Einsaat bis zum Beginn des Zellwachstums zu beschreiben. Mittels dieser ebenfalls *a priori* notwendigen Kenntnis kann die Simulation in Real-time erfolgen. Wie beim Shift Modell wird auch beim logistischen Modell die Annahme getroffen, dass etwa 80 % der Zellsaat auf den Microcarriern anheften. Entsprechend unterliegt der Startwert einer Abschätzung aus dem betrachteten experimentellen Datensatz.

Die Einteilung der Lebendzellzahl in Suspensionszellen und Zellen auf Microcarriern führt beim Attachment Modell zu neuen Parametern, der Attachmentrate (k_{at}) und der Detachmentrate (k_{det}). Der Startwert der Attachmentrate konnte zur Modellierung aus anderen als den hier betrachteten Standardkultivierungen bestimmt werden. Gegenüber den ersten beiden Modellbeschreibungen führt dieser Ansatz zu der Möglichkeit, die Simulation mit der relativ gut bestimmbaren Anzahl der eingesäten Zellen zu beginnen und eine ungenaue Abschätzung des Startwertes zu vermeiden. Die Segregierung der Population ist eine Modellbeschreibung, die mehr auf den biologischen Hintergrund eingeht, der zu der beobachteten Lagphase führt. Die Beschreibung mit einem Shift der Daten oder eine rein mathematische Berücksichtigung zur Erklärung der Lagphase hingegen geht nur deskriptiv auf die beobachtete Dynamik der Messwerte ein.

Alle Modelle sind in der Lage, den zeitlichen Verlauf der Zellzahl und der Metabolite wiederzugeben. Das Shift Modell liefert nur für das Intervall von 8 h

bis hin zum Ende der Prozesszeit ein Ergebnis. Für das Shift Modell und das logistische Modell muss eine Abschätzung des Wertes der Startzellzahl vorgenommen werden. Die besten Simulationsergebnisse, ausgewählt nach dem berechneten Standardfehler (s_r), liefert das segregierte Attachment Modell (Tabelle 5). Es ist als einziges in der Lage, die Abnahme der Zellen nach der Einsaat zu beschreiben und keine Abschätzung vornehmen zu müssen. Ebenfalls können mit diesem Ansatz die Zeitverläufe für die Metabolite besonders gut wiedergegeben werden.

Ziel der Modellierung ist die Gewinnung von Kenntnissen, welche Einflüsse die Prozessvariablen nehmen und somit zur Optimierung des Prozesses oder zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit helfen können. Das Attachment Modell dient als Grundlage, diejenigen Parameter zu identifizieren, die den größten Einfluss auf die Menge der produzierten Zellzahl am Ende der Fermentation haben. Wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, ist eine möglichst hohe Anzahl der lebenden Zellen auf den Microcarriern die Basis für den anschließenden Schritt der Virusinfektion. Bereits die Änderung einiger weniger Parameter erzeugt hinreichende Änderungen in der Zellausbeute. Der in der Simulation leicht mögliche Schritt, diese Parameter zu bestimmen, soll als Grundlage dienen, experimentell zu untersuchen, wie sich diese Änderungen im realen Prozess auswirken können. Das gezeigte Vorgehen führt somit weg von Trial-And-Error Experimenten zu einer effizienteren experimentellen Planung und belegt die intuitive Kenntnis von der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} und X_{max} als einflussreichste Parameter des Prozesses. Weiterhin kann anhand des Modells gezeigt werden, wie eine Streuung der Parameter des Modells die Erwartungswerte der Zellzahl im realen Prozess beeinflusst und ob mit dieser Betrachtung die große Abweichung, wie sie von Experiment zu Experiment beobachtet werden kann, erklärbar ist.

Die Untersuchung der Parametersensitivität des Attachment Modells führt zu den vier einflussreichsten Parametern, der Fläche auf Microcarriern X_{max}, der

maximalen Wachstumsrate μ_{max}, der Attachmentrate k_{at} und der Todesrate k_d. Die Kombination der Änderung mehrerer Parameter gleichzeitig erlaubt eine Erklärung der durch biologische Variation bedingten Schwankungen der Zellausbeute, die im realen Prozess auftreten, wie die Sensitivitätsstudie zeigt. Im realen Prozess ist die Größe X_{max} direkt beeinflussbar durch die Erhöhung der Einwaage der Microcarrier und realisierbar mit einer Kultivierung im Rahmen einer Hochzelldichtekultur (Wu et al., 2004). Sie unterliegt jedoch auch statistischen Schwankungen (Fehler bei der Einwaage, Größenverteilungen laut Angabe des Herstellers), so dass sie ebenfalls mit als wesentlicher Faktor für die Unterschiede in der Ausbeute von Fermentation zu Fermentation gesehen werden kann.

Die maximale Wachstumsrate ist im Wesentlichen nicht beeinflussbar. Der Vergleich der gefundenen Werte für diesen Parameter mit der Literatur (0,03 bis 0,05 h^{-1}) und die Schwankung innerhalb der Fermentationen (0,05 bis 0,10 h^{-1}, Tabelle 4) machen deutlich, dass die Modellvorstellung den tatsächlichen Prozess nicht vollends widerspiegelt, zumal eine Wachstumsrate von 0,10 h^{-1} unrealistisch erscheint. Die Kulturbedingungen sind für alle Experimente gut einstellbar. Bei den Startkonzentrationen der Metabolite ergeben sich nur geringe Schwankungen, der pH-Wert, die Sauerstoffzufuhr und die Temperatur werden im gesamten Prozessintervall geregelt, so dass diese Faktoren nicht mit in das Modell eingehen und die maximale Wachstumsrate beeinflussen können.

Die Attachmentrate, die maximale Wachstumsrate und die Vitalität der Zellen werden hauptsächlich vom Zustand der Vorkultur beeinflusst (Gebb et al., 1983). Die Schädigungen in diesem Zeitraum (Substratmangel, Inhibition durch Metabolite) und das Stadium der Zellen im Zellzyklus (G_0, G_1, S, G_2) zum Zeitpunkt des Scale-Ups haben Auswirkungen auf die Anheftungsphase und das anfängliche Wachstum der Zellkultur. Einen negativen Einfluss hat Trypsin, das zum Scale-Up benötigt wird, um die Zellen von der Rollerflasche

zu lösen. Es wirkt zellschädigend, z.B. ruft eine 10 bis 15 min zu lang anhaltende Trypsineinwirkung irreparable Schäden hervor. Zellen können in diesem Fall nicht an den Carrier anheften oder sich ausreichend abflachen und lösen frühzeitig wieder vom Carrier ab (Hu et al., 1985). Im Wesentlichen wird das Trypsin jedoch durch das dem Medium zugefügte Serum inaktiviert.

Die Todesrate ist im Wesentlichen von der Prozessumgebung abhängig und in einer gut kontrollierten Wachstumsumgebung wenig beeinflussbar. Haupteinfluss auf den Zelltod nehmen die Scherkräfte im Kulturgefäß, was hauptsächlich durch den Rührer und den Sauerstoffeintrag geschieht. Bei diesen Faktoren besteht jedoch kaum Verbesserungsspielraum: Die Rührerdrehzahl wird auf ein Minimum eingestellt, so dass eine gesicherte Durchmischung der Carrier im Medium gewährleistet ist. Der Rührer und das Mischverhalten im Bioreaktor sind in der Regel vom Hersteller optimiert. Der notwendige Gasstrom zum Sauerstoffeintrag wird durch Begasung mit reinem Sauerstoff gegenüber einer Begasung z.B. mit Luft wesentlich reduziert. Außerdem wird durch eine geeignete Gestaltung des Begasungsrohres der Blasendurchmesser gering gehalten und dadurch der zellschädigende Energieeintrag durch den Rührer und den Sauerstoffstrom minimiert. Die Konzentration der toten Zellen nimmt zum Ende der Fermentation hin zu. Wichtig ist, zu betrachten, dass es sich nicht um eine reine Akkumulation der toten Zellen handelt, sondern tote Zellen lysieren und in der Fermentationsbrühe nicht erhalten bleiben. Vielmehr resultiert die Zunahme von toten Zellen aus dem Anstieg der Zahl lebender Zellen auf den Microcarriern, so dass bei gleich bleibender Detachmentrate k_{det} weitaus mehr Zellen in Suspension gehen können. Wie in Abbildung 16 ersichtlich ändert sich die Zahl von Zellen in Suspension nach etwa 30 h im Wesentlichen nicht mehr und erlangt Quasi-Stationarität. Unter Berücksichtigung der größer werdenden Anzahl von sich ablösenden Zellen bedeutet dies eine Zunahme akkumulierter toter Zellen bis zum Ende des Prozessintervalls. Zur Minimierung der Anzahl toter Zellen muss herausgefunden werden, ob neben den genannten Fermentationsbedingungen noch ande-

re Umgebungsbedingungen (zellschädigende Substanzen) einen Einfluss auf das Ablösen der Zellen vom Microcarrier haben. Genaue Kenntnis dieser Faktoren und zusätzlich die Verbesserung der Umgebungsbedingungen der Zellen auf den Microcarriern können weiterhin zu einer Vergrößerung der Attachmentrate und der spezifischen Wachstumsrate führen, was einen weitaus größeren Effekt auf die Erhöhung der Zellzahl hat (Kato et al., 2003). Genzel et al. (2004) haben gezeigt, dass alle Aminosäuren bis zum Ende der Fermentation in ausreichenden Mengen vorhanden sind, bzw. keine kritischen Level erreichen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bisher noch unbekannte Metabolite die Wachstumsgeschwindigkeit beeinflussen (Ronning et al., 1991).

Eine große Bandbreite von Modellen für Zellwachstum und Metabolismus der Zellen wurde in den letzten Jahren präsentiert. Die Hauptzahl der Anwendungen findet sich dabei für Suspensionszellen. Dadurch, dass der Metabolismus tierischer Zellen noch nicht komplett verstanden ist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches der beste Weg zur Modellierung ist. Das Zusammenspiel von ungenauer Messwerterfassung und wenig stringenten Vorgaben für die Modellerstellung lässt noch viel Forschungsbedarf offen.

Für die Modellierung und gegebenenfalls Prozessführung sollten die beiden limitierenden Substrate, Glucose und Glutamin, bestimmbar sein – am besten on-line, so dass eine Zufütterungsstrategie entwickelt werden kann. Dies führt in der Regel zu einem Modellansatz mit zwei limitierenden Substraten, eventuell gekoppelt mit einer Inhibierung des Wachstums durch Lactat und Ammonium, Größen, die ebenfalls gut bestimmbar sind. Für adhärente Zellen muss eine Einschränkung des Wachstums durch die nur begrenzt zur Verfügung stehende Oberfläche im Modell mit berücksichtigt werden. Mit dem in der vorliegenden Arbeit genutzten Ansatz zur Modellierung der abnehmenden Oberfläche können im Rahmen der Fehlerbehaftung der Messwerte die experimentellen Daten hinreichend beschrieben werden. Beim Vergleich der Meta-

bolite aller Fermentationen zeigt sich jedoch eine unterschiedliche Kinetik der Zellen im Prozess, als in der Simulation angenommen wird. Die Simulation sagt einen sanften Übergang zwischen nicht limitiertem Wachstum und Konfluenz voraus, die Zellen im Experiment scheinen hingegen den Stoffwechsel abrupt bei Erreichen der Oberflächenlimitierung zu verändern. Das hat zur Folge, dass die Verbrauchsrate der Substrate zunächst überschätzt und im weiteren Verlauf der Fermentation unterschätzt wird. Für die Inhibitoren zeigt sich das Gegenteil. Eine Überprüfung, ob bei Einführung der neuen Zählmethode der Zellzahl und geringerer Standardabweichung von 15 % eine andere Kinetik bessere Resultate aufweist, scheint sinnvoll.

Neben einer Regelung basierend auf einer on-line Bestimmung der Konzentration von limitierenden Substraten (Biener et al., 1996b, 1997) haben sich Feedstrategien etabliert, die sich auf gut messbare Daten des Sauerstoffverbrauchs der Zellen beziehen (Kyung et al., 1994; Lavric et al., 2005). Voraussetzung einer derartigen modellbasierten Regelung ist eine gute Kenntnis der Parameter des Zellmetabolismus. In Hinblick auf eine Veränderung der Parameterwerte von Kultur zu Kultur (z.B. Ausbeutekoeffizienten, Produktionsraten) bietet sich eine Closed-Loop-Strategy, wie sie von Pörtner et al. (2004) vorgeschlagen wird, an. Um die Akkumulierung von Inhibitoren zu vermeiden, sollte diese Regelung gleichzeitig mit einem Perfusionssystem (eigene Untersuchungen, Merten et al., 1999) kombiniert werden. Unterschiede verschiedener Steady-States können durch Kybernetische Modelle gefunden werden. Sie berücksichtigen das Bestreben einer Zelle, die zur Verfügung stehenden Ressourcen möglichst ökonomisch zu nutzen, d.h. ein vereinfachtes Netzwerk basierend auf den bekannten biochemischen Stoffwechselwegen wird modellhaft abgebildet. Unerlässlich ist die genauere Analyse des Metabolismus der MDCK Zellen, um sie mit einer Zufütterung auf ihr Wachstumsoptimum zu treiben und eine schnelle Propagation auf den Carriern zu gewährleisten. Wie gezeigt wurde ergeben sich für verschiedene Startzellzahlen unterschiedliche Ausbeute- und Produktbildungsraten. Für den Fall, dass MDCK Zellen eben-

falls aufgrund unterschiedlicher Anfangsbedingungen, der Startzellzahl und der Konzentration der Substrate, in verschiedene metabolische Stoffwechselwege gelangen und damit unterschiedliche spezifische Wachstumsraten annehmen, kann eine Ausbeuteverbesserung nicht nur auf Prozessebene sondern auch auf zellulärer Ebene stattfinden.

Sinnvoll zur Vermeidung von Lactat erscheint eine Untersuchung, welchen Einfluss Glucose neben dem inzwischen gut untersuchten Einfluss von Glutamin für MDCK Zellen hat. Es stellt sich die Frage, ob auch hier ein Ersatz des C-Lieferanten z.B. durch Fructose (Duval, 1992) möglich ist oder die Energieversorgung der Zelle ausschließlich mit Glutamin erfolgen und somit einer Produktion von Lactat entgegengewirkt werden kann.

5.2.2 Qualität der Parameter und der experimentellen Daten

Die Bestimmung der Konzentrationen der Metabolite im Kulturmedium wurde mit validierten Analysemethoden durchgeführt. In Hinblick auf die Validierung ist die Bestimmungsgrenze für jede Messgröße gut bekannt und der relative Fehler sehr gering. Ausreißer, die bei der Aufnahme der Datenreihen auftreten, lassen sich in der Regel auf Fehler bei der Probeentnahme oder Kondensatbildung in der Entnahmeeinrichtung zurückführen. Bei Auftreten von Kondensat muss der Messwert dieser Probe verworfen werden. Eine Standardabweichung kann für die systematischen Fehler nicht gegeben werden.

Die Bestimmung der Zellzahlen hingegen ist mit großen Fehlern behaftet. Dadurch ergeben sich Schwierigkeiten bei der Validierung der Modellparameter. Der relative Standardfehler der Zellzahl beträgt 30 % (F56 und F70) bzw. 15 % (F86) bei den betrachteten Fermentationen und setzt sich aus der statistischen Schwankung der Anzahl der Microcarrier im Probevolumen, dem Verhältnis von leeren zu bewachsenen Microcarriern, der Anzahl von Zellen

pro Microcarrier (Besetzungsgrad) und schließlich der Zählmethode (Haemacytometer) der Laborkraft zusammen. Eine neue Methode zur Bestimmung der Zellzahl berücksichtigt die Anzahl der Carrier in der Probe, die dem Kulturvolumen entnommen wurde, und erlaubt eine genauere Bestimmung der Zellen auf den Microcarriern. Die Zählung von Suspensionszellen liefert bessere Ergebnisse, da das entnommene Probevolumen direkt zur Auszählung in der Zählkammer verwendet werden kann (5 bis 10 % relativer Standardfehler).

Weitere Schwierigkeiten liegen bei der Bestimmung der Anzahl toter Zellen vor. Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, dass die Simulationsergebnisse des Modells und die experimentelle Daten stark divergieren. Das Modell schlägt zunächst eine starke Zunahme der toten Zellen vor. Die wenigen Messpunkte in diesem Intervall zeigen einen nicht so drastischen Anstieg. Zudem sind in den Experimenten starke Schwankungen der Anzahl von toten Zellen im zeitlichen Verlauf der Fermentation sichtbar. Eine Verifizierung des Modells ist an dieser Stelle schwierig. Einsaatzellen haben unter Umständen eine andere Sterberate, als Zellen, die sich vom MC ablösen. In diesem Fall ist das Modell unzureichend und muss eine weitere Segregierung der Suspensionszellen, z.B. 1. eingesäte Zellen, 2. neu produzierte, sich ablösende Zellen, 3. „alte“ sich ablösende Zellen, berücksichtigen. Ersichtlich wird jedoch die Schwierigkeit, hierfür exakte Messwerte zu erzeugen. Eine Untersuchung des Verlaufs toter Zellen, ob tatsächlich eine derartige Schwingung wie sie in Abbildung 18 beobachtet werden kann (Schwankungen im Intervall von 0 bis 55 h) erscheint sinnvoll. Tote Zellen sind in der Suspension nicht stabil, sondern gehen schnell in Lyse und geben dabei ihre intrazellulären Pools an Metaboliten in die Fermentationsbrühe ab. Für Hybridomazellen wurde untersucht, dass Lactat und Glutamin hohe intrazelluläre Konzentrationen aufweisen, Lactat im Intervall von 19,5 bis 40 mM, (Schmid et al., 1992; Fernandez et al., 1988; 1990) und Glutamin von etwa 3 bis 11 mM (Schmid et al., 1992), die bei der Lyse der Zelle in das Medium abgeben werden. Durch Betrachtung der akkumulierten toten Zellen und eine Untersuchung der intrazellulären Pools von

MDCK Zellen kann es sinnvoll sein, über einen Eintragsterm von Lactat und Glutamin aufgrund der Zelllyse zu entscheiden. Bei Annahme eines Zellvolumens von etwa 4000 µL sorgen jeweils $2 \cdot 10^4$ lysierende Zellen pro mL, wie sie im Prozess gemessen werden konnten (Abbildung 18), für einen Eintrag von 0,2 bis 1 nM Glutamin (intrazelluläre Konzentration 2,5 bis 11 mM) und 1,6 bis 3,2 nM Lactat (intrazelluläre Konzentration 20 bis 40 mM), was bei einer Lactatkonzentration von 2 bis 35 mM bzw. einer Ammoniumkonzentration von 0,4 bis 2 mM im Medium kaum ins Gewicht fällt. Andere Metabolite sind aufgrund deutlich geringerer intrazellulärer Konzentrationen vernachlässigbar.

Für viele Parameter (z.B. die Ausbeutekoeffizienten, die Attachmentrate, die spezifische maximale Wachstumsrate) kann ein beträchtlicher Standardfehler festgestellt werden. Dies wird gespiegelt durch unterschiedliche Zustände im Metabolismus von Kultur zu Kultur oder sogar Änderungen der Reaktionsraten innerhalb des Zeitintervalls einer Kultur (Cruz et al., 1999; Linz et al, 1997; Frame & Hu, 1991). Regelungen, die auf einer *a priori* Kenntnis der Prozessparameter basieren (Tremblay et al., 1992; Pörtner et al., 1996b) können durch eine Adaptierung der Parameter während des Prozesslaufs verbessert werden. Hier ist der Einsatz eines Expertensystems, wie Fuzzy-Logic oder eines Neural Networks, möglich, um die Identifizierung schlecht bestimmbarer Parameter zu vermeiden (Dhir et al., 2000; Nagata et al., 2003; Teixeira et al., 2005). Auch wenn der Einsatz von Hybridmodellen aus einer klassischen Regelung und einem Blackbox Modell in der Bioprozesstechnik schon vorgestellt wurde (Simutis et al., 1993; Hitzmann et al., 2000; Nagata & Chu, 2003; Galvanauskas et al., 2004; Honda et al., 2004) gibt es nur wenige Ansätze in der Regelung des Substratfeeds zur Optimierung der Ausbeute von tierischen Zellkulturen (Dors et al., 1995; Dhir et al., 2000).

Eine Übersicht der Parameter für unterschiedliche Zellsysteme und einen Vergleich sämtlicher Modellparameter zeigt Tabelle 2. Es zeigen sich gute Übereinstimmungen der an das Attachment Modell angepassten Parameter

mit denen anderer Arbeitsgruppen (Tabelle 3). Der zur Modellanpassung gefundene Wert der spezifischen maximalen Wachstumsrate (Mittelwert von 0,0724 h^{-1}, Standardabweichung 45 %, Anhang A6) ist etwas höher, als der aus weiteren Standardkulturen bestimmte Wert von 0,046 h^{-1} und liegt ebenfalls über den Werten anderer Arbeitsgruppen für dieselbe oder vergleichbare Zelllinien (0,05 bis 0,06 h^{-1}, MCDK (Glacken, 1986), Hybridoma (Biener, 1998)). Eine vergleichbar gute Übereinstimmung ergibt sich für die Produktionsrate von Ammonium (Mittelwert von $0{,}70\cdot10^{-9}$ mmol/Zelle, Standardabweichung von 34 %) mit Hybridoma und CHO Zellen ($0{,}51\cdot10^{-9}$ mmol/Zelle). Unter dem Hintergrund, dass Glucose von den Zellen sehr schlecht genutzt und hauptsächlich zu Lactat umgesetzt wird, erscheint der um einen Faktor 10 größere Wert der Lactatproduktion (Mittelwert von $24{,}2\cdot10^{-9}$ mmol/Zelle, Standardabweichung von 36 %) realistisch im Vergleich zu Hybridoma und CHO Zellen ($2{,}10\cdot10^{-9}$ mmol/Zelle). Die Glucose scheint von den MDCK Zellen im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Zelllinien mehr für den Erhaltungsstoffwechsel der Zellen verwendet zu werden: Der Zellerhaltungskoeffizient (Mittelwert von $1{,}08\cdot10^{-10}$ mmol/(Zelle·h), Standardabweichung von 97 %) ist im Vergleich zu Hybridomazellen um einen Faktor 2 größer ($0{,}5\cdot10^{-10}$ mmol/(Zelle·h)), hingegen ist der Zellerhaltungskoeffizient für Glutamin (Mittelwert von $0{,}06\cdot10^{-10}$ mmol/(Zelle·h), Standardabweichung von 67 %) im Vergleich zu Untersuchungen anderer Forschergruppen zur selben Zelllinie um mehr als einen Faktor 2 kleiner (0,1 bis $0{,}4\cdot10^{-10}$ mmol/(Zelle·h)). Eine gute Übereinstimmung herrscht für die Ausbeutekoeffizienten zur Zellproduktion, die zwar innerhalb der Kultivierungen Standardabweichungen von mehr als 100 % aufweisen, jedoch im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Intervalle liegen (für Glucose 0,3 bis $1{,}7\cdot10^{9}$ Zellen/mmol, für Glutamin 0,5 bis $2{,}4\cdot10^{9}$ Zellen/mmol). Die inhibitorspezifischen Sterbekoeffizienten fallen geringer aus, als in der Literatur beschrieben. Für Lactat beträgt der Mittelwert 20 % gegenüber Hybridoma (3 statt 14 L/mol), für Ammonium 4 % (2 statt 50 L/mol). Für die limitierenden Substrate Glucose und Glutamin ist der Wert der Monod-Konstante K_S im mikromolaren Bereich und damit experimentell

schwer bestimmbar (Nielsen et al., 2003), weshalb die Monodkonstanten nicht angepasst wurden. Einige K_S –Werte für verschiedene Zelllinien sind vergleichend in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten und der gegebenen Kultivierungsbedingungen kann festgestellt werden, dass die Oberfläche der Microcarrier der entscheidende Faktor für die maximal mögliche Zellzahl ist. Die Akkumulation von Inhibitoren oder der Mangel an limitierenden Substraten nimmt unter den gewählten Prozessbedingungen weit weniger Einfluss. Für eine Kultur wie im gegebenen Beispiel scheint also eine Kontrolle der Substrate und damit geringe Produktion von inhibitorisch wirkenden Metaboliten nicht notwendig zu sein. Einzig die Erhöhung der Einwaage von Microcarriern und damit die Vergrößerung der den Zellen zum Wachstum zur Verfügung stehenden Oberfläche erscheint als wirkungsvoller Kandidat zur Optimierung der Zellausbeute. In diesem Fall ist jedoch eine Regelung der limitierenden Substrate statt einmaliger Zugabe zu Beginn der Kultivierung vorteilhaft, um die bei hoher Substratkonzentration zwangsläufige Entstehung von Inhibitoren zu vermeiden, wie es sich bei BHK Zellen zeigt (Teixeira, 2005). Weiterhin lässt sich das Wachstum von adhärenten Zellen durch das Verhältnis des Inokulums zur Anzahl der Microcarrier beeinflussen (Hu et al., 1985b). Die Untersuchung an FS-4 Zellen zeigte, dass eine Erhöhung von Microcarriern allein zu einem schlechteren Wachstum führt als gleichzeitige Erhöhung der Anzahl von Einsaatzellen, da durch das ungünstigere Verhältnis von Saatzellen zu Microcarriern eine größere Anzahl von Carriern leer bleiben kann. Für MDCK Zellen ist hier eine Untersuchung des Optimums dieses Quotienten sinnvoll. Bei der Durchführung einer Hochzelldichtekultur ist eine Zufütterungsstrategie jedoch zwingend notwendig, da andere limitierende Faktoren, wie der erhöhte Verbrauch der Substrate und die damit verbundene Akkumulation von Inhibitoren, und der erhöhte Sauerstoffeintrag berücksichtigt werden müssen. Die anfängliche Zugabe des für die gesamte Fermentation notwendigen Substrats kann zu Wachstumslimitierungen durch Substratinhibierung führen. Weiterhin

können auch schädliche Metabolite durch einen unökonomischen Stoffwechsel der Zellen, begünstigt durch die hohe Substratkonzentration, und aufgrund der größeren Anzahl an Zellen sehr schnell akkumulieren. Ein Substratfeed am unteren Limit der notwendigen Konzentration ist jedoch erst mit Kenntnis der metabolischen Parameter des betrachteten Zellsystems möglich. Durch eine batch oder fed-batch Kultivierung können zwar wichtige Parameter wie die maximale Wachstumsrate und in gewissen Grenzen auch die Sterberate bestimmt werden, jedoch kaum eine Aussage über metabolische Konstanten getätigt werden. Kenntnis darüber kann jedoch gut in Perfusionskulturen gewonnen werden, da diese quasistationäre Wachstumsbedingungen für die Zelllinie liefern. Zu Prüfen ist, ob speziell diese metabolischen Parameter durch Versuchsabläufe in einer Perfusionskammer bestätigt werden können. Für einen universellen Einsatz müssen die Parameter unter verschiedenen Prozessbedingungen (z.B. batch, fed-batch, perfusion) gewonnen werden (Doyle & Griffith, 1998). Zu erwarten ist, dass sich jedoch kein allgemeingültiger Parametersatz für verschiedene Betriebsmodi finden lässt.

Vorteilhaft für die mathematische Modellierung kann sich die Zunahme verfügbarer Daten sämtlicher Bereiche des Bioprozesses sowohl im Upstream (zelluläre Ebene, Reaktor) als auch im Downstream auswirken: Auf der Grundlage solider Datenbasen können Modelle für alle relevanten Teile eines Bioprozesses formuliert werden und somit nicht nur theoretische Untersuchungen und numerische Simulationen erlauben sondern ebenfalls als Hilfsmittel zum experimentellen Design und zur Prozessoptimierung beitragen.

6 Replikation von Influenza A Virus in tierischen Zellen

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Mathematisches Modell

Im vorliegenden Kapitel soll ein einfaches Modell präsentiert werden, dass die Virusdynamik des zweiten Prozessschrittes beschreibt. Das mathematische Modell soll die Schätzung der Anzahl der Virionen ermöglichen, die umgerechnet in HA Einheiten den Vergleich mit den experimentellen Daten erlaubt. Wie in Kapitel (3.2) beschrieben, besteht das grundlegende Modell aus einem System von drei Differentialgleichungen, die die Änderung der Konzentrationen von uninfizierten Zellen (U_C), infizierten Zellen (I_C) und der Anzahl der Virionen (V) über der Zeit beschreiben.

Zu Beginn der Infektion können die uninfizierten Zellen (U_C) auf den konfluent bewachsenen Microcarriern die zum Zeitpunkt der Infektion (TOI = time of infection) zugegebenen Viruspartikel zunächst adsorbieren. In Abhängigkeit von der Virusinfektionsrate (k_{vi}) und dem Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu Zellen im betrachteten Volumen (MOI) werden nicht alle Zellen sofort und zum gleichen Zeitpunkt infiziert. Die infizierten Zellen (I_C) beginnen mit einer spezifischen Virusreplikationsrate (μ_{vir}) freie Viruspartikel (V) zu erzeugen. Die Virionen werden jedoch nicht unmittelbar nach der Infektion produziert sondern erst nach einer zeitlichen Verzögerung (Eclipse Phase oder Eclipse Period), die durch Fenner et al. (1974) eingeführt und durch Ackermann et al. (1998) näher beschrieben wurde (Abbildung 22). Diese Eclipse Period wird durch die Prozesse der Endocytose des Virus, der Synthese der viralen Proteine und der Virus RNA verursacht (Dee et al., 1995; 1997; Reddy & Yin, 1999; Nielsen, 2000).

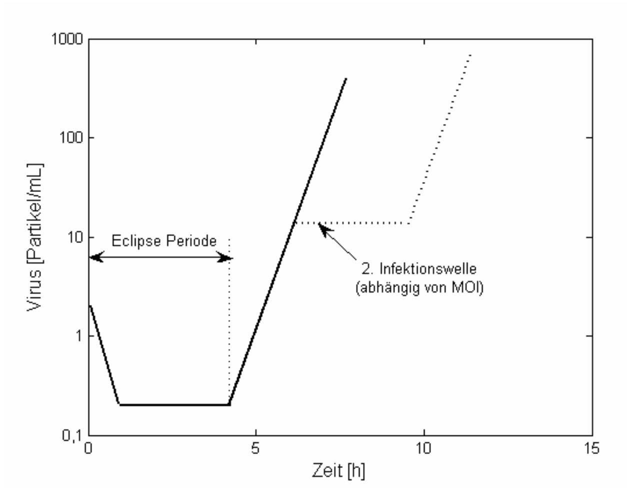

Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf des Replikationszyklus der Virusvermehrung in tierischen Zellen, nach Ackermann et al. (1998).

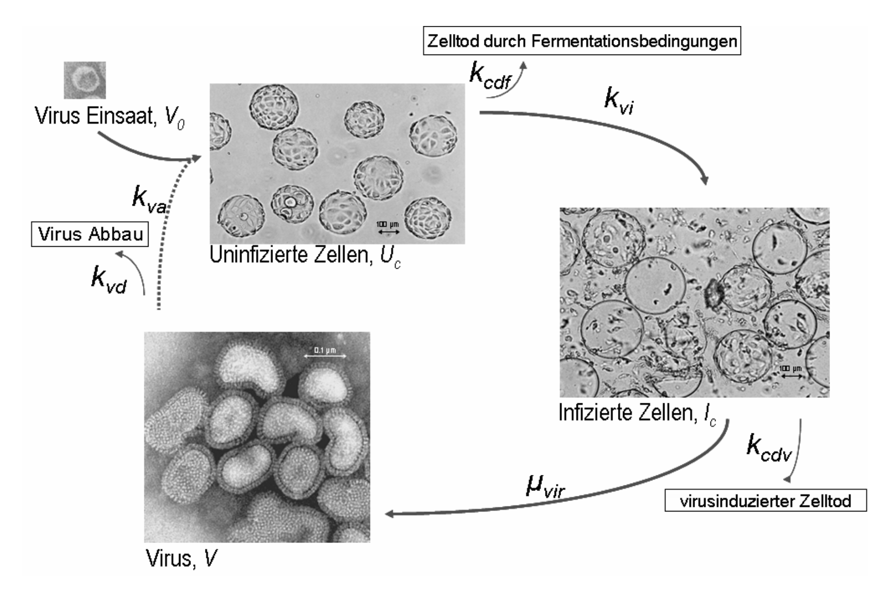

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Zyklus der Influenza Viren in MDCK Zellen. Eine Ausgangsmenge von 10 mL Viruseinsaat (2,4 log HA units/100 µL, $10^{7,1}$ pfu/mL) wird zur Infektion der Zellpopulation ($1{,}2 \cdot 10^6$ Zellen/mL) in 4,6 L Kulturvolumen auf den konfluent bewachsenen Microcarriern verwendet. Die MOI entspricht dabei 0,026.

Nach einer Zeit von etwa 4 bis 6 h (eigene Untersuchungen, Rimmelzwaan et al., 1998), die neben den oben genannten Mechanismen weiterhin durch den Zusammenbau der Virionen charakterisiert ist, werden die neu produzierten Viruspartikel aus der Wirtszelle ausgeschleust. Nicht alle Viruspartikel sind infektiös. Die Viruspartikel docken mit einer Adsorptionsrate (k_{va}, **v**irus **a**ttachment) an die noch vorhandenen uninfizierten Zellen an und können diese dann in einer Kettenreaktion mit einer Infektionsrate (k_{vi}, **v**irus **i**nfection) infizieren. Dieser Zyklus endet, wenn alle Zellen infiziert sind (Abbildung 23).

Die Produktion der Viruspartikel endet mit dem Zeitpunkt des Zerfalls der infizierten Zellen aufgrund der durch die Infektion herbeigeführten Zellschädigung und der dadurch induzierten Apoptose (programmierter Zelltod, Govorkova et al., 1996). Die Zellen sterben mit einer virusbedingten spezifischen Sterberate (k_{cdv}, **c**ell **d**eath due to **v**irus infection). Die Viruspartikel, die in die Fermentationsbrühe abgegeben werden, sind nicht stabil. Der HA verringert sich durch die Aktivität unspezifischer Proteasen, die sich im Medium befinden, sehr langsam mit einer Virusdegradationsrate (k_{vd}, **v**irus **d**ecay). Als weiterer Einfluss wird die Schädigung der uninfizierten Zellen durch die Fermentationsbedingungen betrachtet (z.B. Scherung durch Rührereinfluss), die dann mit einer spezifischen Todesrate (k_{cdf}, **c**ell **d**eath due to **f**ermentation conditions) sterben.

Für den Modellansatz der Beschreibung der Virusproduktion in Zellkultur werden zunächst folgende Annahmen getroffen:

- Neue Zellen entstehen nur durch Zellteilung uninfizierter Zellen, solange Platz auf den Microcarriern zur Verfügung steht.
- Infizierte Zellen produzieren ausschließlich Viruspartikel und können sich nicht vermehren.
- Substrate sind ausreichend im Medium vorhanden.
- Inhibitoren (z.B. Lactat, Ammonium) erreichen während der Replikationsphase keine inhibitorischen Level (Genzel et al., 2004).

- Zum Infizieren einer Zelle wird mindestens ein Viruspartikel benötigt.
- Uninfizierte Zellen sterben in geringem Maße durch fermentationsbedingte physikalische Einflüsse.
- Infizierte Zellen sterben hauptsächlich aufgrund der Virusinfektion. Der wesentlich kleinere Anteil der schädigenden physikalischen Einflüsse wird in dieser Rate mit berücksichtigt.

6.1.1.1 Modellgleichungen

Das mathematische Modell beschreibt die grundlegenden Interaktionen zwischen den Wirtszellen und den Viruspartikeln. Die Anzahl der uninfizierten Zellen (U_C) nimmt mit einer spezifischen Wachstumsrate μ zu und mit einer spezifischen Todesrate aufgrund der Fermentationsbedingung k_{cdf} ab. Dabei ist die Infektion proportional zum Produkt der Konzentration der uninfizierten Zellen (U_C), der Konzentration freier Viruspartikel (V) und der Virusinfektionsrate k_{vi}. Dieser Term führt sowohl zu der Abnahme der uninfizierten Zellen (U_C) als auch der Zunahme der infizierten Zellen (I_C) und ist folglich mit entsprechendem Vorzeichen in den Gleichungen (48) und (49) enthalten:

$$\frac{dU_c}{dt} = \mu_{IV} \cdot U_c - k_{cdf} \cdot U_C - k_{vi} \cdot U_C \cdot V \qquad (42)$$

Die adhärenten Zellen vermehren sich nur, wenn sie nicht infiziert sind, an einen Microcarrier angeheftet und nicht schon kontaktinhibiert sind, also noch Fläche auf dem Carrier zur Verfügung steht. Die maximale Anzahl von MDCK Zellen pro konfluent bewachsenem Carrier beträgt etwa 250 Zellen (eigene Daten). Die durch oben genannte Infektion der uninfizierten Zellen (U_C) entstehenden infizierten Zellen (I_C) zerfallen mit einer spezifischen Todesrate k_{cdv} hauptsächlich bedingt durch virusinduzierten Zelltod:

$$\frac{dI_C}{dt} = k_{vi} \cdot U_C \cdot V - k_{cdv} \cdot I_C \qquad (43)$$

Infizierte Zellen (I_C) produzieren mit einer spezifischen Virusreplikationsrate μ_{vir} freie Viruspartikel (V) nach einer Verzögerungszeit (Todzeit oder eclipse phase) τ. Freigesetzte Virionen werden entweder mit einer spezifischen Rate k_{vd} abgebaut oder mit einer spezifischen Adsorptionsrate k_{va} von aufnahmefähigen uninfizierten Zellen (U_C) adsorbiert:

$$\frac{dV}{dt} = \mu_{vir} \cdot I_C(t-\tau) - k_{vd} \cdot V - k_{va} \cdot U_C \cdot V \qquad (44)$$

In einer Variante des Modells wird statt der Zeitverzögerung in der Bilanzgleichung (delay differential equation, DDE) des Delay Modells eine Verschiebung der Simulationsergebnisse vorgenommen (Shift Modell) (Möhler et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, werden die Zellen vor der Infektion gewaschen, um die während der Zellkultur produzierten Metabolite zu beseitigen und frisches serumfreies Medium für die Replikationsphase zugegeben. Da die wesentlichen Energieträger für den Metabolismus (Glucose und Glutamin) bis zum Ende dieses zweiten Prozessschrittes in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen und inhibitorisch wirkende Metabolite (Lactat und Ammonium) keine kritischen Konzentrationen erreichen, werden sie in diesem Modellteil nicht berücksichtigt. Die spezifische Wachstumsrate (μ) ist proportional zur maximalen spezifischen Wachstumsrate (μ_{max}) sowie zum Grad der Kontaktinhibierung. Dieser wird bestimmt durch die Anzahl der durch das Microcarriersystem angebotenen freien Plätze (X_{max}) und deren Belegung von uninfizierten und infizierten Zellen ($U_C + I_C$):

$$\mu_{IV} = \mu_{\max} \cdot \frac{X_{\max} - (U_C + I_C)}{X_{\max}} \qquad (45)$$

6.1.1.2 Parameterschätzung

Tabelle 5 zeigt die Anfangswerte und Parameter, die für die Simulation herangezogen wurden. Die Schätzung der Parameter geschah hauptsächlich aufgrund eigener Experimente, da in der Literatur keine Quellen zur Dynamik der Influenza A Virusreplikation in MDCK Zellen in Microcarrierkultur zu finden sind. Die spezifische Todesrate der Zellen aufgrund der Fermentationsbedingungen (k_{cdf}) wurde aus mehreren Experimenten ermittelt (0,001 h^{-1}, Tabelle A6), indem die Anzahl der Zellen einer Microcarrierkultur im Überstand bestimmt wurde, ohne die Zellen infiziert zu haben. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} wurde zu 0,03 h^{-1} aus der exponentiellen Wachstumsphase der experimentellen Daten der verwendeten Zellkultur zur Virusreplikation bestimmt (F33, Anhang Kapitel A5; Tabelle A6). Das Verhältnis der Adsorptionsrate des Virus k_{va} zur Infektionsrate k_{vi} wird auf der Basis, dass mehr als ein Influenza Viruspartikel benötigt wird, um eine Zelle zu infizieren, zu 500 gesetzt: Nicht jedes Virion ist infektiös (Knipe et al., 2001; Roy et al., 2000; Bancroft & Parslow, 2002) bzw. mehr als ein Viruspartikel kann an eine Zelle andocken, da die Zellen eine beträchtliche Anzahl an Oberflächenproteinen besitzen, mit denen Virionen gebunden werden können. Eine infizierte Zelle ist in der Lage, weit mehr als 10.000 Viruspartikel pro Tag zu bilden, was einer spezifischen Virusreplikationsrate (μ_{vir}) von mehr als 420 h^{-1} entspricht. Die Todesrate der Zellen aufgrund der Virusinfektion (k_{cdv}) wurde durch den Anstieg toter Zellen in der Suspension zu 0,013 h^{-1} bestimmt (Tabelle A6). Für das Shift Modell wurde die Zeitverzögerung für den Shift der Zeitachse der Simulationsergebnisse (Viruspartikel bzw. HA) aus der Differenz des ersten sichtbaren Anstiegs des HA Titers (etwa 16 h, Abbildung 25) und der Zeit, zu der sichtbar infizierte Zellen auf dem Microcarrier auftreten (etwa 4 h, Abbildung 24), zu τ = 12 h bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass zum Zeitpunkt der Infektion bei einer MOI von 0,026 (entsprechend $3{,}4 \cdot 10^4$ infektiöse Viruspartikel pro mL) etwa $2{,}6 \cdot 10^7$ Viruspartikel pro mL zugegeben werden müssen.

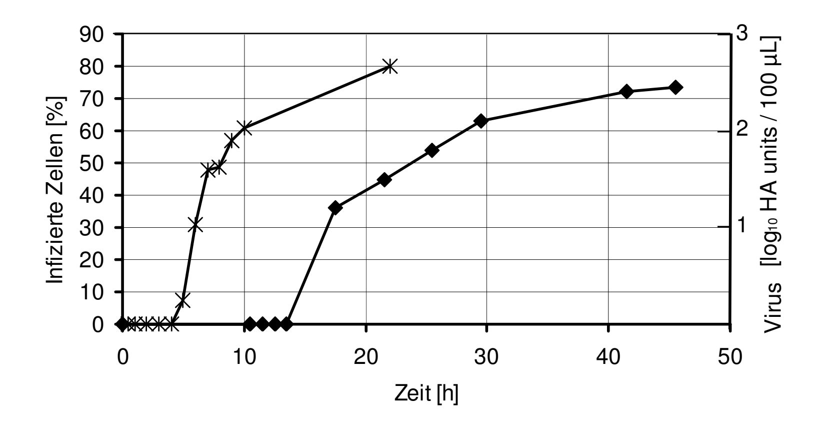

Abbildung 24: Prozentsatz sichtbar infizierter Zellen auf Microcarriern (-x-) und Zunahme des HA Titers (-♦-) während der Virusreplikation.

6.1.2 Simulationsergebnisse

Zunächst wurden die Simulationen mit dem Shift Modell durchgeführt, wobei jedoch die Zeitachse der Simulationsergebnisse des HA Titers um τ = 12 h verschoben wurde, um die Zeitverzögerung zwischen Infektion und Produktion nachzubilden. Die Simulation mit dem gewählten Parametersatz (Tabelle 6) brachte einen Virustiter hervor, der unterhalb des Wertes der experimentellen Daten lag. Eine Optimierung der Parameter mittels einer Minimierung der Fehlerquadratsumme (Nelder-Mead Algorithmus) führte zu einem Parametersatz, der für eine gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den Messdaten sorgt (Abbildung 25). Die für das Zellwachstum spezifischen Parameter k_{cdf} und μ_{max} wurden nicht anhand der Virusdaten optimiert, sondern als während der gesamten Kulturzeit konstant angenommen.

Direkt nach der Infektion nimmt die Konzentration infizierter Zellen um weniger als $30 \cdot 10^3$ Zellen/mL zu, was rechnerisch der gewählten MOI von 0,026 entspricht. Die uninfizierten Zellen nehmen um den gleichen Wert ab. Das Ne-

Tabelle 6: Anfangsparameter und gefittete Parameter für das Shift Modell mit $\tau \cong$ 12 h und das Delay Modell mit τ = 4,5 h. Wert der maximalen Zellkonzentration $X_{max} = 1{,}6{\cdot}10^6$ Zellen/mL und Anfangswerten zum Zeitpunkt $t_0 = 0$: $(U_{C,0};I_{C,0};V_0)^T = (1{,}2\cdot10^6;0;2{,}6\cdot10^7)^T$.

Parameter	anfänglicher Wert[1]	beste Anpassung an Datensatz	Einheit
k_{cdf}	0,001	0,001	$\frac{1}{h}$
μ_{max}	0,03	0,03	$\frac{1}{h}$
k_{vi}	0,002	0,0014	$\frac{mL}{h}$
k_{va}	1	0,8	$\frac{mL}{h}$
μ_{vir}	420	482	$\frac{1}{h}$
k_{cdv}	0,013	0,0257	$\frac{1}{h}$
k_{vd}	0,003	0,009	$\frac{1}{h}$

[1] von Einzelexperimenten oder Literatur gewonnene Parameter

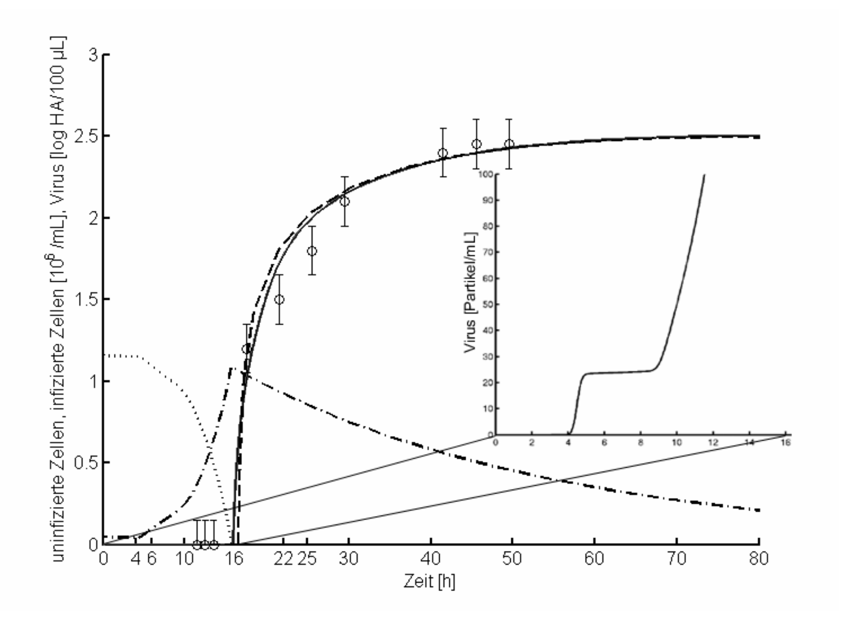

Abbildung 25: Experimentelle Daten und Simulationsergebnisse der Zellinfektion und der Virusausbeute (HA Titer): (o) HA Titer (log_{10} HA Einheiten/100 µL; Mittelwert ± Standardabweichung von 0,15 log_{10} HA Einheiten/100 µL). Die Linien geben die Simulationsergebnisse wieder: HA des Shift Modells mit Zeitverschiebung um 12 h (---) und zeitverzögertes Modell mit Delay von τ = 4,5 h: uninfizierte Zellen (···), infizierte Zellen (-·-) und HA (—). Nebenbild (Vergrößerung des Intervalls von 0 bis 16 h): Anstieg der Anzahl der Viruspartikel innerhalb der ersten Stunden nach Infektion, Delay Modell.

benbild (Abbildung 25) macht deutlich, dass nach etwa 4,1 h, also etwas früher als dem gewählten Delay die ersten Viruspartikel, ausgeschleust werden und sich kurz darauf etwa 24 Partikel/mL in der Suspension befinden. Dabei ist zu beachten, dass diese Konzentration noch nicht von dem HA Assay erfasst werden kann (Nachweisgrenze etwa $4 \cdot 10^7$ Viruspartikel/mL. Zu diesem Zeitpunkt werden weitere Zellen von den neu entstandenen Viruspartikeln infiziert, die Zahl der uninfizierten Zellen nimmt entsprechend ab. Nach etwa neun Stunden steigt die Anzahl von Viruspartikeln im Medium stark an, was eine neue Infektionswelle anzeigt. Nach etwa 16 h sind ausreichend Virionen produziert, um alle uninfizierten Zellen infizieren zu können und das Maximum der infizierten Zellen erreicht (Abbildung 25). Zeitgleich ist ein deutlicher Anstieg des HA Titers zu beobachten. Der HA Verlauf der Simulation zeigt über das ganze Zeitintervall gute Übereinstimmung mit den experimentellen Werten. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Infizierung der Zellen, der anhand einer Untersuchung mit einem Laserscanning Mikroskop erhalten wurde (Abbildung 26, a) bis f)), zeigt sich ein Auftreten der ersten infizierten Zellen nach etwa 4 h, was sich durch grüne Fluoreszenz bemerkbar macht. Innerhalb der nächsten Stunden nimmt die Anzahl der fluoreszierenden Zellen stark zu, zum Zeitpunkt 22 h sind alle Zellen infiziert. Das Maximum des simulierten HA Titers ist nach etwa 80 h erreicht, hingegen bleibt der gemessene Titer im Experiment bereits nach 45 h konstant (Abbildung 25). Der Metabolismus und Sauerstoffverbrauch der infizierten Zellen endet nach 2 bis 3 Tagen (siehe Abbildung 2). Wie auch in Experimenten gezeigt wurde, befinden sich zum Zeitpunkt der Ernte keine lebenden Zellen mehr in der Fermentationsbrühe (Genzel et al., 2004). Das Verhältnis von infizierten Zellen zur Gesamtzellzahl auf Microcarriern sowie den Anstieg des HA Titers zeigt Abbildung 24. Ein großer Anstieg des Titers ist zu verzeichnen, wenn etwa 60 bis 70 % der Zellen sichtbar infiziert sind. Der höchste HA Titer wird etwa 45 h nach der Infektion erhalten. Die Simulationen mit Zeitverschiebung (Shift Modell) und das Delay Modell zeigen keinen Unterschied in der Dynamik. Bei beiden Modellen ist der Hauptanstieg des HA Titers nach etwa 16 h zu ver-

zeichnen, das Maximum der Viruspartikel (V_{max}) erscheint nach 80 h. Die Fehlerquadratsumme nach der Optimierung und der Restfehler für beide Modellierungsarten (Shift und Delay Modell) sind in Tabelle 7 dargestellt.

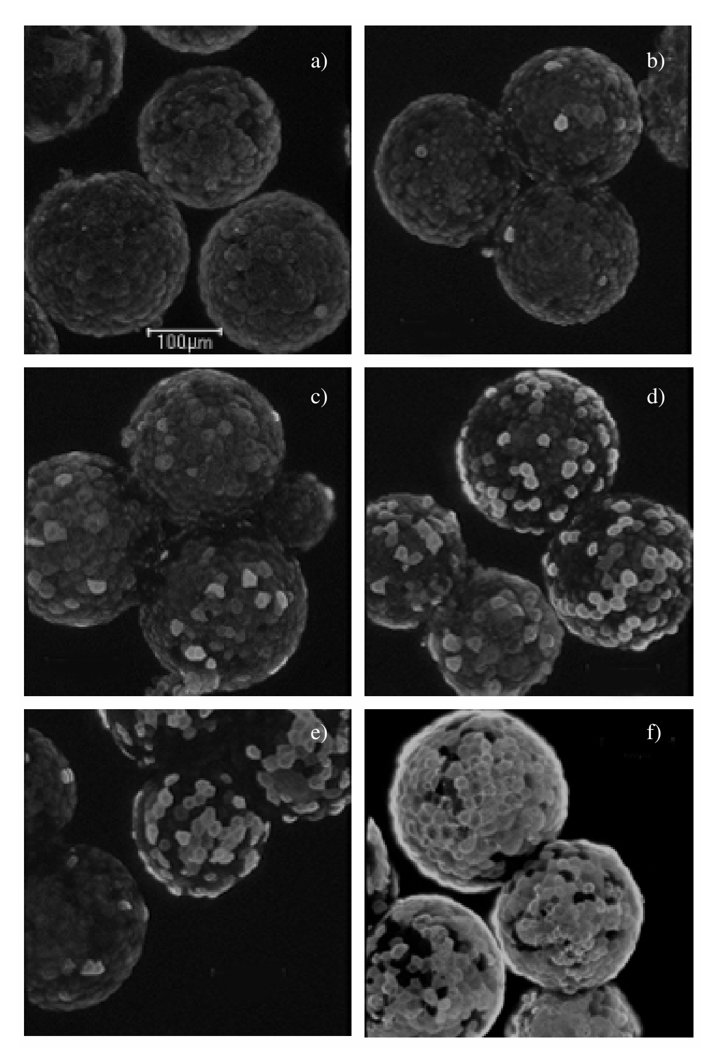

Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Infektion von MDCK Zellen mit Influenza Virus nach a) 2 h, b) 4 h, c) 5 h, d) 6 h, e) 7 h, f) 22 h.

Tabelle 7: Vergleich der Fehlerquadratsumme (FQS) und des Restfehlers (s_r) des Shift Modells und des Delay Modells.

Modellvergleich	τ	Anzahl angepass-ter Parameter	Anzahl Mess-werte	FQS	s_r
Shift Model	12 h	5	10	$1{,}79 \cdot 10^{18}$	$7{,}73 \cdot 10^{8}$
Delay Model	4,5 h	6	10	$3{,}67 \cdot 10^{17}$	$4{,}28 \cdot 10^{8}$

Es zeigt sich eine deutlich höhere Fehlerquadratsumme *FQS* des Shift Modells (fast eine Zehnerpotenz Unterschied), der Restfehler s_r hingegen weist durch die höhere Parameterzahl im Delay Modell gegenüber dem Shift Modell nur eine Verringerung um etwa 44 % auf.

Wie in Möhler et al. (2005) gezeigt, lassen sich für den optimierten Parametersatz zu beiden Modellen, wenn alle Zellen uninfiziert sind und eine geringe Konzentration von Viren eingesät wird, der Virusertrag zu 18.755 und die Wurfgröße zu 32,82 berechnen.

6.1.3 Parametersensitivitäten

Um einen Einblick zu erhalten, welche Parameter für eine Änderung der Virusausbeute verantwortlich sind und zum besseren Verständnis des Prozesses wurde sowohl für das Delay Modell als auch für das Shift Modell eine Parametersensitivitätsanalyse durchgeführt. Die Simulationen wurden für das Shift Modell in Matlab, für das Delay Modell in DIVA durchgeführt.

Diese schematische Untersuchung, die hier den Einfluss der Parameter auf das interessierende Endergebnis, die maximale Virusausbeute, charakterisieren soll, wurde derart durchgeführt, dass jeder Parameter einzeln um 10 % ausgelenkt und die Abweichung von V_{max} in Prozent berechnet wurde. Dabei muss der Zeitpunkt des Maximalwertes mit dem neuen Parametersatz nicht gezwungenermaßen mit dem des optimierten Satzes übereinstimmen (Abbildung 27).

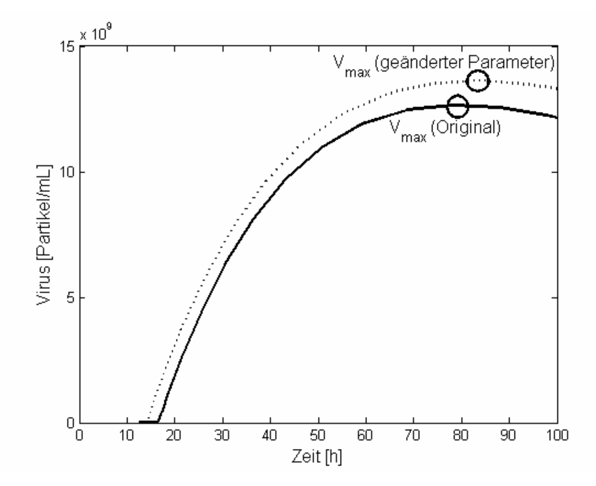

Abbildung 27: Änderung des Absolutwertes und des zeitlichen Auftretens der maximalen Virusausbeute bei Veränderung des Parametersatzes, exemplarisch für das Shift Modell.

Tabelle 8: Auswirkungen der Änderung von μ_{vir}, k_{cdv}, k_{va} und k_{vi} auf die maximale Virusausbeute V_{max}.*

shift Modell (12 h)	I: 90%	II: 100%	III: 110%	% I vs. II	% III vs. II
μ_{vir}	$1{,}11 \cdot 10^{10}$		$1{,}37 \cdot 10^{10}$	89,69%	110,34%
k_{cdv}	$1{,}33 \cdot 10^{10}$	$1{,}24 \cdot 10^{10}$	$1{,}16 \cdot 10^{10}$	107,64%	93,59%
k_{va}	$1{,}24 \cdot 10^{10}$		$1{,}23 \cdot 10^{10}$	100,47%	99,64%
k_{vi}	$1{,}23 \cdot 10^{10}$		$1{,}24 \cdot 10^{10}$	99,71%	100,40%
alle	$1{,}03 \cdot 10^{10}$		$1{,}48 \cdot 10^{10}$	83,00%	119,36%
Delay Modell (4,5 h)					
μ_{vir}	$1{,}11 \cdot 10^{10}$		$1{,}36 \cdot 10^{10}$	89,72%	110,32%
k_{cdv}	$1{,}33 \cdot 10^{10}$		$1{,}15 \cdot 10^{10}$	107,50%	93,53%
k_{va}	$1{,}24 \cdot 10^{10}$	1,23E+10	$1{,}23 \cdot 10^{10}$	100,35%	99,68%
k_{vi}	$1{,}23 \cdot 10^{10}$		$1{,}24 \cdot 10^{10}$	99,65%	100,30%
alle	$1{,}03 \cdot 10^{10}$		$1{,}45 \cdot 10^{10}$	83,14%	119,15%

* Die Parameter wurden zunächst einzeln um ± 10% und dann die einflussreichsten zusammen ausgelenkt: μ_{vir} -10%, k_{cdv} +10%, k_{va} +10% und k_{vi} –10% zur Verringerung, μ_{vir} +10%, k_{cdv} -10%, k_{va} -10% und k_{vi} +10% zur Erhöhung der maximalen Virusausbeute. Ergebnisse auf 2 Nachkommastellen gerundet.

Es wird folglich nur eine Verbesserung oder Verschlechterung des Absolutwertes, nicht jedoch der Produktionszeit berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser schematischen Untersuchung bei Auslenkung der einflussreichsten Parameter um jeweils ± 10 % zeigt Tabelle 8.

Es wurden Simulationen für jede Parameteränderung mit den gleichen Anfangswerten durchgeführt. Eine Auslenkung von μ_{vir} von 482 h^{-1} auf 530 h^{-1} führt zu einer Erhöhung der Virusproduktion um 10,34 % ($1{,}37 \cdot 10^{10}$ Viruspartikel/mL statt $1{,}24 \cdot 10^{10}$ Viruspartikel/mL für das Shift Modell). Als Parameter mit zweitgrößtem Einfluss vergrößert k_{cdv} die Ausbeute um etwa 7,64 % bei Verringerung der Sterberate von 0,0257 h^{-1} auf 0,0213 h^{-1} im Shift Modell. Veränderungen der für die Geschwindigkeit der Infektion verantwortlichen Parameter k_{va} und k_{vi} zeigen einen kaum merklichen Einfluss auf die maximale Virusausbeute. So führt beispielsweise eine Erhöhung von k_{va} um 10 % zu einer Ausbeutesteigerung von weniger als 0,5 % beim nicht zeitverzögerten Shift Modell. Alle anderen Parameter zeigen keine signifikante Auswirkung auf die maximale Anzahl der Viruspartikel bei Änderung um $\pm$ 10 %.

Darüber hinaus wurde die Auswirkung aller Parameter mit jeweils negativem und positivem Einfluss untersucht. Dazu wurden μ_{vir} um –10 %, k_{cdv} um +10 %, k_{va} um +10 % und k_{vi} um –10% zur Verringerung und μ_{vir} um +10 %, k_{cdv} um –10 %, k_{va} um –10 % und k_{vi} um +10% zur Erhöhung der maximalen Virusausbeute verändert und die Abweichung des Maximums berechnet (Tabelle 7, Zeile „alle“), was zu einer Abnahme um 17,00 % und einer Zunahme um 19,36 % von V_{max} beim nicht zeitverzögerten Shift Modell bzw. einer Abnahme um 16,86 % und einer Zunahme um 19,15 % von V_{max} beim Delay Modell führt. Beide Modelle miteinander verglichen zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei den Auswirkungen einer Änderung der einzelnen Parameter.

Abbildung 28 zeigt die Abhängigkeit der maximalen Virusausbeute von den Parametern μ_{vir}, k_{cdv} und k_{va} über einen weiten Bereich für das Modell ohne Zeitverzögerung. Die Markierung kennzeichnet dabei das Ergebnis der Simulation des anhand der experimentellen Daten optimierten Parametersatzes. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen V_{max} und μ_{vir} (Abbildung 29, a) mit einer Steigung von $2{,}63 \cdot 10^{7}$ h/mL, d.h. eine Verdoppelung von μ_{vir} von 482 h^{-1} auf 964 h^{-1} unter Beibehaltung aller anderen Parameter sorgt für einen

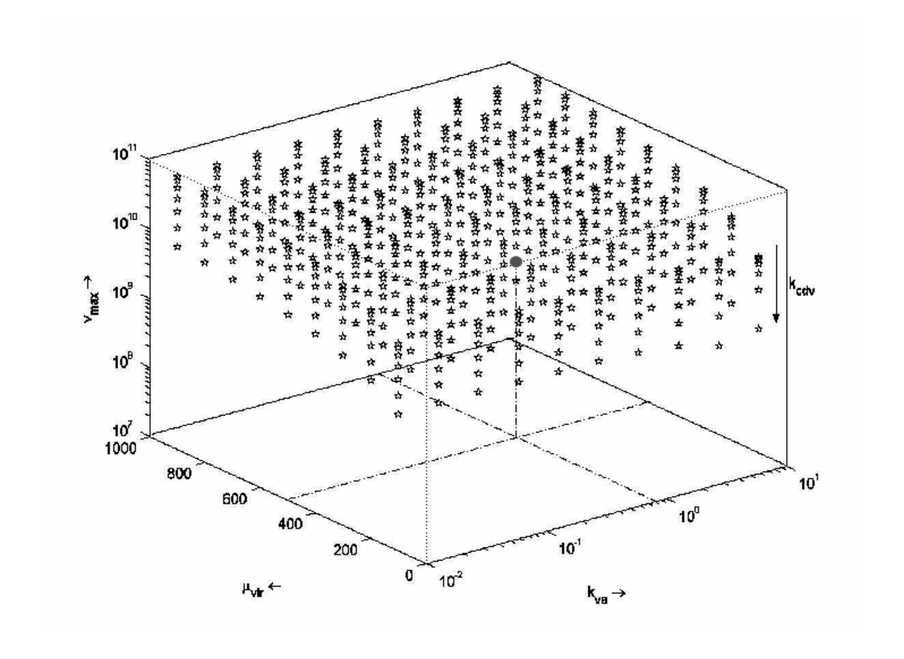

Abbildung 28: Einfluss von Parametervariationen von μ_{vir}, k_{cdv} und k_{va} auf die maximale Virusausbeute beim Shift Modell. Die gestrichelten Linien und die Markierung (●) kennzeichnen V_{max} des anhand der experimentellen Daten optimierten Parametersatzes.

Anstieg der maximalen Viruszahl von 1,27 auf $2{,}54 \cdot 10^{10}$ Partikel/mL was einer Ausbeutesteigerung um 0,3 log HA/100 µL entspricht. Für die spezifische Todesrate der Zellen aufgrund der Virusinfektion k_{cdv} zeigt sich wie erwartet bei Verringerung eine Verlängerung der Produktionszeit für Viruspartikel, jedoch mit weniger signifikantem Einfluss auf V_{max} als bei einer Änderung von μ_{max}. Sichtbar ist das Erreichen eines Maximalwertes bei niedrig gewählter Todesrate (Abbildung 29 b): In dem Intervall von 0,1 h^{-1} bis 0,002 h^{-1} kann eine exponentielle Zunahme der Ausbeute festgestellt werden. Bei weiterer Verringerung der Todesrate wird jedoch ein Limit von $5{,}5 \cdot 10^{10}$ Partikel/mL erreicht.

Eine Veränderung der Parameter hat jedoch auch eine zeitliche Verschiebung des Maximums zur Folge. Es wird desto eher erreicht, je höher μ_{vir} bzw. je

niedriger k_{cdv} ist. Bei 10 %iger Vergrößerung von μ_{vir} z.B. reduziert sich die Zeit bis zum Erreichen des Maximums um 6 %, bei Verringerung von k_{cdv} um 10 % sogar um 9 %. Für das oben genannte Beispiel (k_{cdv} = 0,0001 h^{-1}) bedeutet dies einen Erntezeitpunkt von t = 484 h (20 Tage). Bei einer Ernte nach etwa 45 h, in Anlehnung an die Prozessbedingungen, werden $1{,}62 \cdot 10^{10}$ Partikel/mL produziert, was einer Ausbeutesteigerung von etwa 28 % gleichkommt.

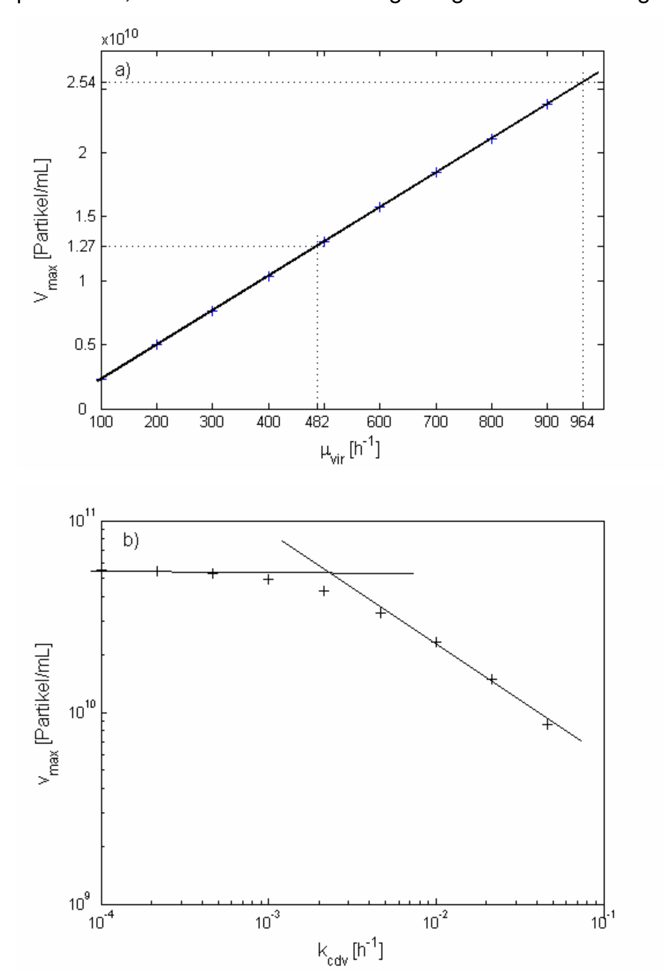

Abbildung 29: Einfluss der Parameteränderungen von μ_{vir} a) and k_{cdv} b) auf die maximale Virusausbeute V_{max}, exemplarisch für das Shift Modell.

6.1.4 Abhängigkeit der Virusausbeute von Startzellzahl, MOI und Delay

Im Folgenden soll untersucht werden, welchen Einfluss die Anfangswerte der Anzahl uninfizierter Zellen $U_{c,0}$ und der Viruspartikel V_0 und die daraus resultierende MOI auf den maximalen Virusertrag haben und inwiefern der intrazelluläre Delay τ einen Einfluss auf die Dynamik der Virusreplikation nimmt. Unter Beibehaltung der Werte aller Parameter werden unabhängig voneinander $U_{c,0}$, V_0 und τ geändert und Simulationsstudien durchgeführt.

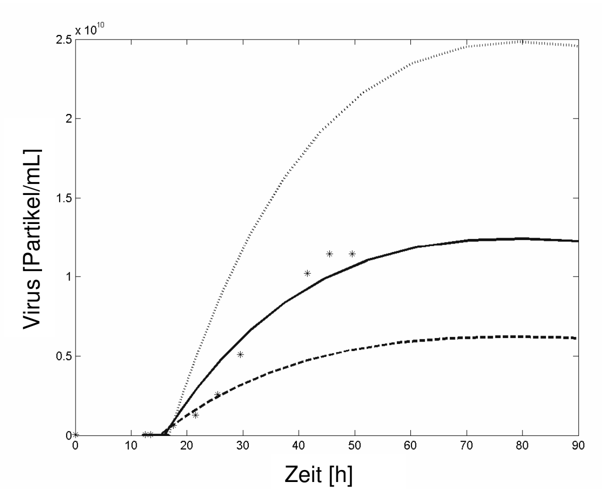

Abbildung 30: Erhöhung des Anfangswertes der Anzahl uninfizierter Zellen, Simulation mit $U_{c,0}$ = (0,6 (---); 1,2 (—); 2,4 (···))·10^6 Zellen/mL mit gleich bleibender MOI. Berechnete Viruspartikel aus den Messwerten des HA im Vergleich (*).

Einfluss der Startzellzahl $U_{c,0}$

Eine Vergrößerung der Startzellzahlen bei gleich bleibender MOI, also proportionaler Erhöhung der Virussaat, liefert eine Vergrößerung der Virusausbeute. Eine Verdoppelung der Startwerte von 1,2 auf 2,4·10^6 Zellen/mL führt zu einer Verdoppelung der Ausbeutesteigerung von 1,27 auf 2,52·10^{10} Viruspartikeln/mL, entsprechend wirkt sich eine Halbierung aus (Abbildung 30). Es besteht ein linearer Zusammenhang bei gleichzeitiger Berücksichtigung einer Erhöhung der Carrier (Anhang 8, Tabelle A2). Eine Erhöhung der Carrierzahl

führt neben der Vergrößerung der Virusausbeute gleichzeitig zu einem geringfügig früheren Auftreten des Maximums.

Einfluss der MOI

Die Änderung der MOI nimmt im Wesentlichen keinen Einfluss auf die Höhe der Ausbeute, ändert jedoch den Zeitpunkt des Auftretens des Maximums (Abbildung 31). Bei höheren MOI kann die Verschiebung des Maximums hin zu früheren Zeitpunkten beobachtet werden. Wie in der Vergrößerung sichtbar (Abbildung 31, b) werden gleich nach dem ersten Zyklus bei hoher MOI deutlich mehr Viruspartikel ausgeschleust, als bei geringer MOI (Faktor 10 von MOI = 0,007 zu MOI = 0,052), was zu einem früheren Erreichen des Maximums der Viruspartikel führt.

Einfluss des intrazellulären Delays

Entsprechende Beobachtungen zeigen sich bei einer Verringerung des Delays (Abbildung 32). Die Höhe des Maximums der Viruspartikel bleibt unbeeinflusst, es wird deutlich früher erreicht. Ursache ist die frühere Ausschleusung von Viruspartikeln. Wie der Ausschnitt zeigt (Abbildung 32, b), ändert sich die Konzentration der Partikel nach dem ersten Zyklus nicht, der zeitliche Vorsprung summiert sich nach jedem Zyklus (3 h zu Beginn des ersten Zyklus, 6 h zu Beginn des zweiten Zyklus im Vergleich des Delays von 3 h zu 6 h).

Abbildung 31, a) – b): Erhöhung des Anfangswertes der Viruspartikel unter Beibehaltung der Startzellzahl $U_{c,0}$ von $1{,}2 \cdot 10^6$ Zellen/mL, Simulation mit $V_0 = (0{,}62;\ 1{,}15;\ 2{,}3;\ 4.6) \cdot 10^7$ Viruspartikel/mL entsprechend einer MOI = 0,007; 0,013; 0,026; 0,052. a) Simulationsergebnisse (—) und experimentelle Daten (o) des HA zum Vergleich, b) Ausschnitt des zeitlichen Verlaufs der Viruspartikel im Intervall [0...20 h].

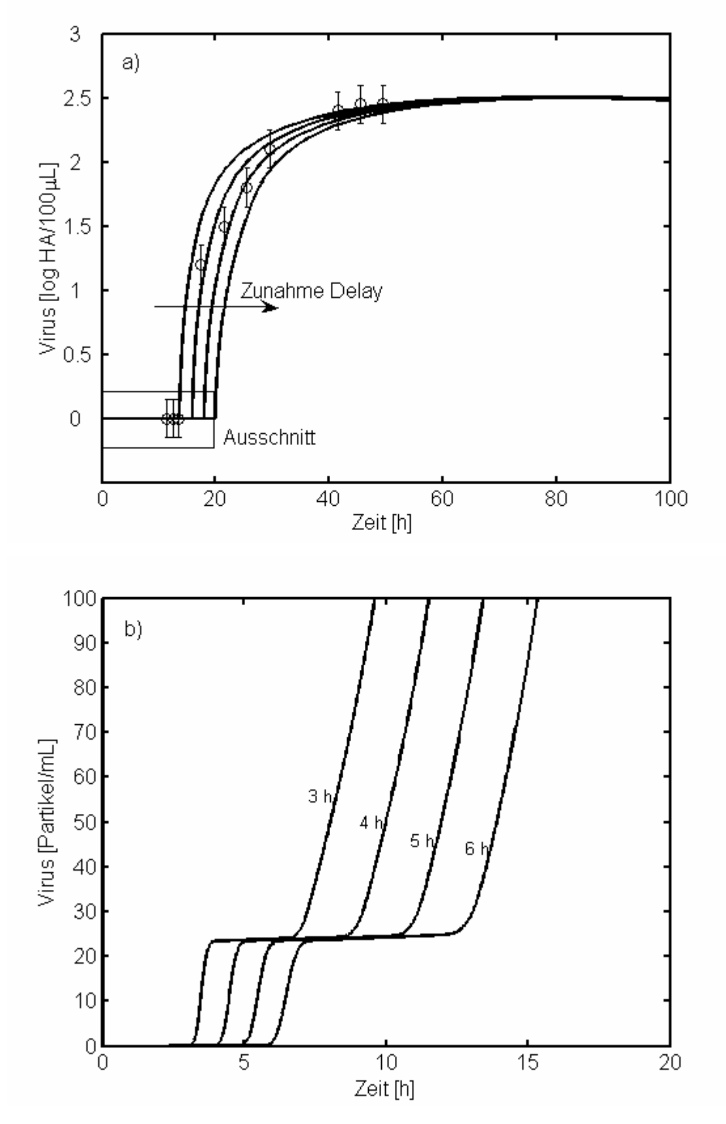

Abbildung 32, a) – b): Erhöhung des intrazellulären Delays τ, Simulation mit τ = 3 h, 4 h, 5 h und 6 h. a) Simulationsergebnisse (—) und experimentelle Daten (o) des HA zum Vergleich, b) Ausschnitt des zeitlichen Verlaufs der Viruspartikel im Intervall [0...20 h].

6.2 Diskussion

Im vorhergehenden Kapitel wurde ein grundlegendes Modell für die Replikation von Pferdeinfluenza Virus in MDCK Zellen in einem Microcarriersystem präsentiert. Die zeitlichen Verläufe der Viruspartikel der Simulationsergebnisse des Shift und des Delay Modells wurden in Übereinstimmung zum verwendeten Test in Logstufen umgerechnet [log HA/100 µL] und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die Simulationen wurden sowohl mit einem Shift des experimentellen Datensatzes als auch mit einem Delayterm durchgeführt, um die intrazelluläre Verzögerung zwischen Infektion der Zellen und des Austretens des Virus aus der Zelle abzubilden. Es wurde eine systematische Variation der Parameter durchgeführt, um eine Sensitivität der Parameter hinsichtlich der maximalen Virusausbeute V_{max} darzustellen. Beide Modellvarianten zeigen vergleichbare Ergebnisse für V_{max}, so dass für die Betrachtung der Erhöhung der Virusausbeute und zur Bestimmung des Einflusses der Prozessparameter ein System mit gewöhnlichen Differentialgleichungen, unter Anwendung eines Zeitshifts der experimentellen Daten, angewendet werden kann. Ein System mit zeitverzögerten Differentialgleichungen wäre in der numerischen Lösung wesentlich anspruchsvoller. Um die Signifikanz der Simulationsergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Viruspartikel und V_{max} zu interpretieren, müssen jedoch Einschränkungen berücksichtigt werden. Alle Assays, die benutzt wurden um die Virusausbeute zu bestimmen, wie HA oder Tissue Culture Infective Dose ($TCID_{50}$) bauen auf einer Verdünnungsreihe des Virus enthaltenen Kulturmediums auf (Mahy & Kangro, 1996). Diese Assays haben eine Standardabweichung von mindestens ±0,15 bis ±0,3 log Einheiten. Entsprechend ergeben sich Abweichungen der Simulationsergebnisse der maximalen Virusausbeute V_{max} in den Grenzen von 71 bis 141 % oder 50 bis 200 %, was zu Schwierigkeiten bei der Validierung des Modells anhand der experimentellen Daten führt. In Hinblick auf Optimierungsanforderungen können Verbesserungen in der Virusausbeute von 19 % wie sie bei

gleichzeitiger Parametervariation festgestellt werden konnten (Tabelle 7) nicht als relevant betrachtet werden. Ebenfalls können derartige Variationen nicht die Abweichungen von 0,3 bis 0,6 log Einheiten von Batch zu Batch erklären, wie sie in der Praxis bei der GMP Produktion von Influenza Virus auftreten können (Reichl, 2000). Weitere Untersuchungen sind notwendig, die die Reproduzierbarkeit und die Optimierung dieses Prozesses in Hinblick auf ein besseres Verständnis spezifischer Virus-Host Interaktionen, des Zellzustandes und der Prozessbedingungen zum Zeitpunkt der Infektion ermöglichen.

Die Zellen werden zur Impfstoffherstellung mit einer geringen MOI infiziert, um die Produktion großer Volumina von Saatvirus zu vermeiden. Mit einer MOI von 0,001 bis 0,01, die typischerweise bei der Herstellung von Influenzavakzinen verwendet wird (Genzel et al., 2004; Tree et al., 2001; Kistner et al., 1998), werden mehrere Zyklen von Anheften der Viruspartikel an die Zellen, Virusreplikation und Ausschleusen neuer Viruspartikel benötigt, bis alle im Prozess vorhandenen Zellen infiziert sind. Ein mathematisches Modell, das die für die Virusproduktion auf zelluläre Ebene notwendige Zeitverzögerung außer Acht lässt, kann diesen wichtigen Aspekt der Virusdynamik nicht wiedergeben. Nach einer Parameteroptimierung in DIVA zur Anpassung der Simulation an die experimentellen Daten ergab sich eine Zeitverzögerung von 4,5 h bevor erste Viren in der Überstand abgegeben werden, was gut mit den durchgeführten Experimenten (Abbildung 25) und anderen Publikationen übereinstimmt (Rimmelzwaan et al., 1998). Im Gegensatz zum Shift Modell ergibt sich innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion (≈ 4,5 bis 9 h) ein stufenförmiger Anstieg der Viruspartikel pro mL (Abbildung 31 b). Auch wenn ein derartiger Verlauf aufgrund theoretischer Betrachtungen für eine geringe MOI (< 0,01) sehr wahrscheinlich ist, kann er aufgrund der Einschränkungen des Haemagglutinations Assays experimentell nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für den HA Test liegt bei 0,3 log HA/100µL, was umgerechnet etwa 4 bis $8 \cdot 10^7$ Viruspartikeln pro mL entspricht. Im unmittelbaren Zeitraum nach der Infektion bei niedriger MOI werden alle eingesäten und die zunächst

produzierten Viruspartikel von den uninfizierten Zellen adsorbiert. Die Zunahme des HA Titers im Medium kann erst nach der Ausschleusung einer großen Anzahl von Viruspartikeln aus den infizierten Zellen, für das genannte Beispiel nach dem zweiten oder dritten Zyklus, nachgewiesen werden (Rimmelzwaan et al., 1998). Eine Erhöhung des MOI hat eine geringe Verkürzung der Produktionszeit, jedoch keine Ausbeutevergrößerung zur Folge. Diese Beobachtung wird von Licari & Bailey (1992) bestätigt. Die zeitlichen Abläufe im Infektionszyklus sind stark abhängig von der Anzahl infizierender Viruspartikel pro Zelle, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in Hinblick auf die Replikation des viralen Genoms die Infektion schneller ablaufen kann, je mehr Virusmaterial zur Verfügung steht, was jedoch nur Einfluss auf das zeitliche Auftreten des Maximums des Virusertrages aber nicht auf dessen Größe nimmt.

Beide hier vorgestellten Modelle sind zwar in der Lage, den Zeitverlauf der Viruspropagation hinreichend genau zu beschreiben, ein experimenteller Nachweis zur Validierung des Modells bzgl. der Dynamik uninfizierter und infizierter Zellen ist jedoch schwierig. Das Hauptproblem liegt bereits in der Definition einer infizierten Zelle. Zur Modellierung wird eine Zelle nach erfolgreichem Eintreten eines Viruspartikels als infiziert betrachtet. Dies im Experiment zu verifizieren ist jedoch schwierig. Üblicherweise werden infizierte von uninfizierten Zellen durch Labellingtechniken (Immunofluoreszenz), RNA Hybridisierung oder mikroskopische Untersuchungen der Veränderung der Morphologie unterschieden. Keine dieser Techniken ist jedoch in der Lage, diese Klassifizierung bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion ($\leq$ 4 h) vorzunehmen. Aus diesem Grund wurden die Modellparameter nicht an die Ergebnisse der Bestimmung des prozentualen Verlaufs der infizierten Zellen angepasst (Abbildung 24). Von der Parameteroptimierung wurden μ_{max} und k_{cdf} unter der Annahme, dass die maximale spezifische Wachstumsrate uninfizierter Zellen und die Sterberate durch Kultivierungsbedingungen nicht von der Infektion beeinflusst werden, ausgeschlossen.

Bezug nehmend auf die Ergebnisse der Simulationen lassen sich mehrere Wege ableiten, die Ausbeuten zu erhöhen. Den größten Einfluss hat die Zellzahl zu Beginn der Infektion. V_{max} ist proportional abhängig von $U_{c,0}$, solange während der Replikationsphase keine Limitierungen der Substratkonzentrationen oder in der Sauerstoffversorgung oder Inhibierungen durch entstehende Metabolite auftreten. Derzeit sind in der Zellkulturtechnik mit Microcarriersystemen Zellzahlen von bis zu $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL möglich, die dann zum Zeitpunkt der Infektion (time of infection, TOI) zur Verfügung stehen. In der Arbeitsgruppe wurden mit MDCK Zellen bis zu $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL erreicht. Somit ergibt sich als eine Möglichkeit zur Erhöhung der Virusausbeute die Vergrößerung der Startzellzahl U_C zum Infektionszeitpunkt. Als zweiter Einfluss ergibt sich die Optimierung des Virus-Host Systems (Ludwig et al., 1999), wobei hier der Schwerpunkt in μ_{vir} und k_{cdv} zu sehen ist. Zur Erhöhung der maximalen Virusproduktionsrate werden bereits Techniken genutzt, die auf der Grundlage der Genmanipulation (Palese et al., 1996) oder Mischinfektion von hochproduktiven Laborstämmen mit dem benötigten Wildtyp besser produzierende Viren erzeugen (Gendon et al., 2005; Voeten et al., 1999).

Weiterhin ist ein besseres Verständnis der durch das Influenza Virus induzierten Apoptose notwendig (Zamarin et al., 2005), um die Auslösung des Zelltods verhindern oder mindestens verzögern zu können (Uchide et al., 2005; Lowy et al., 2003; Lin et al., 2002; Mastrangelo, 1999, 1995). Wie Arden & Betenbaugh (2004) für verschiedene Zelllinien (CHO, VERO, BHK) gezeigt haben, lässt sich die Produktionszeit von Biopharmaka wie Monoklonalen Antikörpern, Vakzinen und Wachstumsfaktoren, durch Anti-Apoptose Strategien verlängern. Übertragen auf die Influenzaproduktion könnte eine Verringerung von k_{cdv} zu einer höheren Virusausbeute beitragen, die jedoch zur merklichen Ausbeutesteigerung um einen Faktor > 4 verringert werden müsste.

Auch wenn die Änderung von μ_{vir} und k_{cdv} eine Möglichkeit zur Ausbeutesteigerung aufzeigt, sollte deren Einfluss nicht überschätzt werden. Zur signifikan-

ten Erkennung mit dem Haemagglutinations Assay muss eine Erhöhung der Anzahl der Viruspartikel von mindestens 50 % vorliegen. Weiterhin sagt das Modell bei der Verringerung von k_{cdv} das Erreichen eines Maximalwertes voraus ($\approx 5{,}5\cdot10^{10}$ Viruspartikel/mL, Abbildung 29 b), da ein weiterer Anstieg durch den Zerfall der Viruspartikel verhindert wird. Gleichzeitig wird jedoch ebenfalls das Auftreten des Maximums mit Verlängerung der Produktionszeit der infizierten Zellen zu deutlich späteren Zeitpunkten verschoben. Der gefundene Parameterwert von k_{cdv} = 0,0257 h^{-1} entspricht einer mittleren Lebensdauer der infizierten Zellen von 39 h, was sich mit dem Erreichen des Maximums der Konzentration der Viruspartikel deckt und auch im Experiment zu Ernten nach 2 bis 3 Tagen nach Infektion führt. Eine Sterberate unter 0,004 h^{-1} entspricht bereits einer mittleren Lebensdauer von mehr als 10 Tagen und hätte demnach eine notwendige Verlängerung der Kultivierung von etwa 3 Tagen zur Folge, um etwa das 1,5 fache an produzierten Viruspartikeln im Vergleich zum Ergebnis des Originalparametersatzes auszuschöpfen (Anhang 10, Abbildung A8). Im Hinblick auf Prozessoptimierungen spielen jedoch ebenfalls Produktionszeiten eine wichtige Rolle.

Für den dargestellten Prozess ergeben sich unter Verwendung des optimierten Parametersatzes für den Virusertrag 18.755 Partikel pro Zelle und für die Wurfgröße 32,82 Neuinfektionen pro infizierte Zelle (Möhler et al., 2005, vergl. Nowak & May, 2000). Verglichen mit den Ergebnissen von Sidorenko und Reichl (2004) ist die Virusproduktion durch intrazelluläre Ressourcen wie Precursor mRNA, Nucleotide und Aminosäuren in den Zellen limitiert. Innerhalb von 15 h Produktionszeit stehen der Zelle intrazelluläre Pools für die Produktion von ca. 13.000 Viruspartikeln zur Verfügung. Der Vergleich mit typischen Virusausbeuten von Standardkulturen (etwa 13.000 Viruspartikel pro Zelle) zeigt, dass die tatsächliche Virus-Zell Ausbeute unterhalb des mathematisch bestimmten Maximums liegt.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand mathematischer Modellbeschreibungen die grundlegenden Reaktionsmechanismen des Wachstums adhärenter Zellen und der Virusreplikation von Influenza A Virus in MDCK Zellen untersucht. Das Wachstumsmodell nimmt zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Lebendzellzahl eine Segregierung in Zellen in Suspension, Zellen auf Microcarriern, die sich vermehren können, und tote Zellen vor. Dabei werden die wichtigsten Substrate Glucose und Glutamin und die Inhibitoren Lactat und Ammonium berücksichtigt. Zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs des Virustiters wird eine Segregierung in uninfizierte und infizierte Zellen vorgenommen und die intrazelluläre Verzögerung zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Auftreten der ersten produzierten Viruspartikel berücksichtigt.

Die Identifikation der Modellparameter erfolgte auf der Grundlage experimenteller Daten aus mehreren Standardkultivierungen und wenn notwendig aus Einzelexperimenten. Nicht direkt zu bestimmende Parameter wurden der Literatur entnommen. Aufgrund dieser Basis wurde eine Parameteroptimierung vorgenommen. Eine Untersuchung der Parametersensitivitäten führten zu der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max}, der maximal möglichen Zellzahl X_{max} im Prozess, der durch die Microcarrier begrenzt ist, der Attachmentrate k_{at}, die das Anheften der eingesäten Zellen an die Carrier beschreibt und der spezifischen Sterberate k_d als einflussreichste Parameter bezogen auf die maximale Zellausbeute. Für das Virusreplikationsmodell ergeben sich die spezifische Virusreplikationsrate μ_{vir}, die spezifische Sterberate der infizierten Zellen k_{cdv} und die Konzentration der uninfizierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion $U_{C,0}$ als die einflussreichsten Parameter in Bezug auf die maximale Virusausbeute.

8 Ausblick

Die vorgestellte Modellierung des Zellwachstums adhärenter tierischer Zellen und der Virusreplikation von Influenza A Viruspartikeln zeigt auf, dass es möglich ist, schwer bestimmbare Prozessgrößen wie den zeitlichen Verlauf der Zellzahl und des HA-Titers anhand von Metabolitenkonzentrationen bzw. dem Verhältnis von infizierten zu uninfizierten Zellen vorhersagen zu können. Das hier präsentierte Zellwachstumsmodell soll mit zwei weiteren Modellansätzen, einem Zellzyklusmodell (Bock, Dissertationsschrift in Vorbereitung) und einem zellulären Automatenmodell (Drasdo et al., in submission), das die Teilungsfähigkeit der Zellen nur zu bestimmten Zeiten im Zellzyklus berücksichtigt, bzw. nicht auf Einschränkungen von limitierenden Substraten und Inhibitoren eingeht, sondern eine Restriktion des Wachstum nur durch die Belegung der Oberfläche der Microcarrier geschieht. Für das vorgestellte Modell des Zellwachstums adhärenter tierischer Zellen wurden die wichtigsten Substrate und Inhibitoren berücksichtigt. Innerhalb der Arbeitsgruppe stehen die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen sämtlicher Aminosäuren zur Verfügung, aus denen charakteristische Amminosäuren, die eine Korrelation zum Verlauf des HA-Titers aufzeigen (z.B. Glutamin, gezeigt in Genzel et al., 2004), ausgewählt und in das Modell integriert werden sollen. Eine Berücksichtigung von Glutamat im Wachstumsmodell und Integration dieses Modellteils in das Virusmodell könnte eine Vorhersage des optimalen Erntezeitpunktes aus leicht messbaren Metabolitenkonzentrationen ermöglichen.

Simulationen mit dem Attachment Modell zeigten im Vergleich zu den experimentellen Daten Unstimmigkeiten im zeitlichen Verlauf der Metabolite Glucose und Lactat. Eine Änderung des Ansatzes zur Beschreibung der Oberflächenlimitierung, oder eine weitere Segregierung in kontaktinhibierte Zellen und teilungsfähige Zellen auf Microcarriern und deren Unterschiede im Metabolismus könnte eine Verbesserung des Modells bewirken, was in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden sollte.

Ackermann HW, Berthiaume L, Tremblay M. 1998. Virus Life in Diagrams. Boca Raton: CRC. 221 p.
Arathoon WR, Birch JR. 1986. Large-scale cell culture in biotechnology. Science 232:1390-1395.
Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. Trends Biotech 22(4):174-180.
Bailey JE. 1998. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. Biotech Prog 14:8-20.
Bailey JE, Ollis DF. 1986. Biochemical engineering fundamentals. New York: McGraw-Hill. 376 p.
Bancroft C, Parslow T. 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of influenza A virus genome. J Virol 76:7133-7139.
Barrett T, Inglis SC. 1985. Growth, Assay and Purification of Influenza Viruses. In: Mahy B, editor. Virology: A practical approach. Oxford: IRL Press. p 264.
Batt BC, Kompala DS. 1988. A structured kinetik modeling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures. Biotech Bioeng 34:515-531.
Beucher O. 2002. MATLAB und Simulink. München: Pearson Studium. 232 p.
Beyeler W, DaPra E, Schneider K. 2000. Automation of Industrial Bioprocesses. In: Scheper T, editor. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin: Springer-Verlag. p 139-164.
Biener R, Breuel G, Kendlbacher T, Kremling A, Oswald G, Gilles E. Model-Based Monitoring and Control of Biotechnological Processes; 1996; Lille, France.
Biener R, Gilles E. 1997. Model-based control of animal cell culture. In: MJT C, al. e, editors. Animal Cell Technology. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 639-645.
Biener R, Noé W, Haas J, Schuller D, Schorn P, Gilles ED. 1998. Metabolisch strukturierte Modellierung und modellgestützte Prozessführung tierischer Zellkulturen. Automatisierungstechnik 46(8):386-394.
Biener R, Waldraff W, Noe W, Haas J, Howaldt M, Gilles E. 1996b. Model-based monitoring and control of a monoclonal antibody production process. Ann N Y Acad Sci 782:272-285.
Biran A, Breiner M. 1997. MATLAB 5 für Ingenieure. Braun S, Häuser H, translator. München: Addison Wesley. 542 p.
Birch J, Onakunle Y. 2005. Biopharmaceutical proteins: opportunities and challenges. Methods Mol Biol 308:1-16.
Bocharov G, Ludewig B, Bertoletti A, Klenerman P, Junt T, Krebs P, Luzyanina T, Fraser C, Anderson R. 2004. Underwhelming the Immune Response: Effect of Slow Virus Growth on CD8+ -T-Lymphocyte Responses. J Virol 78(5):2247-2254.
Bock A. 2002. Charakterisierung und Modellierung des Wachstums von adhärenten tierischen Zellen in Microcarriersystemen am Beispiel von Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK) [Diploma Thesis]. Magdeburg: Otto-von-Guericke Universität.
Bungay HR. 2000. Computer applications in bioprocessing. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 70:100-138.
Büntemeyer H, Marzahl R, Lehmann J. 1994. A direct computer control concept for mammalian cell fermentation processes. Cytotechnol 15(1-3):271-279.
Burleson F, Chambers T, Wiedbrauk D. 1992. Virology: A Laboratory Manual. San Diego: Academic Press Inc. 250 p.
Butler M. 1985. Growth limitations in high density microcarrier cultures. Dev Biol Stand 60(1985):269-280.
Carrel A. 1912. On the permanent life of tissues outside the organism. J Exp Med 15:516.
Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp P, Wang D. 2001. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. Biotechnol Bioeng 72(1):55-61.
Cherry RS, Papoutsakis ET. 1989. Modelling of contact-inhibited animal cell growth on flat surfaces and spheres. Biotechnol Bioeng 33:300-305.
Chotteau V, Bastin G, Mareels I, Fabry L. Reaction mechanisms and cell density estimators for animal cell cultures; 1995; Garmisch-Patenkirchen. p 66-71.
Claes J, Impe Jv. 1999. On-line estimation of the specific growth rate based on viable biomass measurements: experimental validation. Bioproc Engin 21:389-395.
Clark H, Kritchevsky D. 1972. Growth and attenuation of rabies virus in cell cultures of reptilian origin. Proc Soc Exp Biol Med 139(4):1317-1325.
Clynes M. 1998. Animal Cell Culture Techniques. Berlin: Springer-Verlag. 618 p.
Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 270:347-349.
Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJ. 2000. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. Enzyme Microb Technol 27(1-2):43-52.

Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJ. 1999. Metabolic Shifts by Nutrient Manipulation in Continuous Cultures of BHK Cells. Biotechnol Bioeng 66(2):104-113.

Cushing JM. 2004. Differential Equations: An Applied Approach. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, Inc. 402 p.

Dahari H, Major M, Zhang X, Mihalik K, Rice C, Perelson A, Feinstone S, Neumann A. 2005. Mathematical modeling of primary hepatitis C infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production. Gastroenterology 128(4):1056-1066.

Dalili M, Sayles G, Ollis D. 1990. Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: Experiment and model. Biotechnol Bioeng(36):74-82.

de Tremblay M, Perrier M, Chavarie C, Archambault J. 1992. Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed case. Bioprocess Eng 7:229-234.

Dee KU, Hammer DA, Shuler ML. 1995. A Model of the Binding, Entry, Uncoating, and RNA Synthesis of Semiliki Forest Virus in Baby Hamster Kidney (BHK-21) Cells. Biotechnol Bioeng 46:485-496.

Dee KU, Shuler ML. 1997a. A Mathematical Model of the Trafficking of Acid-Dependent Enveloped Viruses: Appliction to the Binding, Uptake, and Nuclear Accumulation of Baculovirus. Biotechnol Bioeng 54.

Dee KU, Wood HA, Shuler ML. 1997b. Inducing Single-Cell Suspension of BTI-TN5B1-4 Insect Cells: II. The Effect of Sulfated Polyanions on Baculovirus Infection. Biotech Bioeng 54(3):208-220.

Dhir S, Morrow KJ, Rhinehart RR, Wiesner T. 2000. Dynamic Optimization of Hybridoma Growth in a Fed-Batch Bioreactor. Biotechnol Bioeng 67(2):197-205.

Dhurjati PS, Leipold RJ. 1990. Biological Modeling. In: Omstead DR, editor. Computer Control of Fermentation Processes. Boca Raton: CRC Press.

DiMasi D, Swartz R. 1995. An energetically structured model of mammalian cell metabolism. 1. Model development and application to steady-state hybridoma cell growth in continuous culture. Biotechnol Prog 11(6):664-676.

Dixit N, Layden-Almer J, Layden T, Perelson A. 2004. Modeling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. Nature 432:922-924.

Dors M, Simutis R, Lübbert A. 1995. Hybrid Process Modeling for Advanced Process State Estimation, Prediction and Control Examplified at a Production-Scale Mammalian-Cell Culture. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 209:9-Btec.

Doverskog M, Ljunggren J, Ohman L, Häggstrom L. 1997. Physiology of cultured animal cells. J Biotechnol 59(1-2):103-115.

Doyle A, Griffith JB. 1998. Modeling. In: Doyle A, Griffith JB, editors. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. New York: Wiley. p 160-178.

Doyle A, Griffiths JB. 2000. Haemocytometer Cell Counts and Viability Studies. In: Doyle A, Griffiths JB, editors. Cell and Tissue Culture for Medical Research. London: John Wiley & Sons, Ltd.

Doyle A, Griffiths JB. 2001. Cell and Tissue Culture for Medical Research. Chichester: John Wiley & Sons. 443 p.

Ducommun P, Bolzonella I, Rhiel M, Pugeaud P, von Stockar U, Marison I. 2001. On-Line Determination of Animal Cell Concentration. Biotechnol Bioeng 72:515-522.

Durrschmid M, Landauer K, Simic G, Klug H, Keijzer T, Trampler F, Oudshoorn A, Groschl M, Müller D, Doblhoff-Dier O. 2003. Comparison of fluidized bed and ultrasonic cell-retention systems for high cell density mammalian cell culture. Biotechnol Prog 19(3):1045-1048.

Duval D, Demangel C, Miossec S, Geahel I. 1992. Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. Hybridoma 11(3):311-322.

Eagle H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122:501-504.

Enders JF, Weller TH, Robbins FC. 1949. Cultivation of lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. Science 109:85.

Ershov F, Tazulakhova E, Zhdanov V. 1976. Induction of chick interferon in transplantable mouse cells. Dokl Akad Nauk SSSR 231(2):474-477.

Eshima N, Tabata M, Kikuchi H, Karukaya S, Taguchi T. 2001. Analysis of the infection system of human T-cell leukaemia virus type I based on a mathematical epidemic model. Stat Med 20:3891-3900.

Fenner F, McAuslan B, Mims C, Sambrook J, White D. 1974. The biology of animal viruses. San Diego, CA: Academic Press. 177 p.

Fernandez E, Mancuso A, Clark D. 1988. NMR spectroscopy studies of hybridoma metabolism in a simple membrane reactor. Biotechnol Prog 4:173-183.

Fernandez E, Mancuso A, Murphy M, Blanch H, Clark D. 1990. Nuclear magnetic resonance methods for observing the intracellular environment of mammalian cells. Ann NY Acad Sci 589:459-475.

Flint J, Racaniella V, Krug R. 2000. Principles of virology: molecular biololgy, pathogenesis, and control. Washington: ASM Press. 804 p.

Forestell S, Kalogerakis N, Behie L, Gerson D. 1992a. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. Biotechnol Bioeng 39:305-313.

Forestell S, Milne B, Kalogeratis N, Behie L. 1992b. A cellular automaton model for the growth of anchorage-dependent mammalian cells used in vaccine production. Chem Eng Sci 47:2381.

Frahm B, Lane H, Märkl H, Pörtner R. 2003. Improvement of a mammalian cell culture process by adaptive, model-based dialysis fed batch cultivation and auppression of apoptosis. Bioprocess Biosyst Eng 26:1-10.

Frahm B, Lane P, Hendrik A, Munack A, Hoffmann M, Hass VC, Pörtner R. 2002. Adaptive, Model-Based Control by the Open-Loop-Feedback-Optimal (OLFO) Controller for the Effective Fed-Batch Cultivation of Hybridoma Cells. Biotechnol Prog 18:1995-1103.

Frame KK, Hu W-S. 1988. A Model for Density-Dependent Growht of Anchorage-Dependent Mammalian Cells. Biotechnol Bioeng 32:1061-1066.

Frame KK, Hu WS. 1991. Comparison of growth kinetics of producing and nonproducing hybridoma cells in batch culture. Enzyme Microb Technol 13(9):690-6.

Fredrickson AG, Megee RDr, Tsuchiya HM. 1970. Mathematical Models for Fermentation Processes. In: Perlman D, editor. Advances in Applied Microbiology. New York: Academic Press. p 419-465.

Fu P, Barford JP. 1994. Methods and strategies available for th process control and optimization of momoclonal antibody production. Cytotechnology 14:219-232.

Funk G, Fischer M, Joos B, Opravil M, Gunthard H, B L, Bonhoeffer S. 2001. Quantification of in vivo replicative capacity of HIV -1 in different compartments of infected cells. J Acq Immun Def Synd 26(397-404).

Galvanauskas V, Simutis R, Lübbert A. 2004. Hybrid process models for process optimisation, monitoring and control. Bioprocess Biosyst Eng 26(6):393-400.

Gebb C, Lundgren B, Clark J, Lindskog U. 1983. Harvesting and subculturing cells growing on denatured-collagen coated microcarriers (Cytodex 3). Dev Biol Stand 55:57-65.

Gendon I, Markushin S, Akopova I, Koptiaeva I, Nechaeva E, Mazurkova I, Radaeva I, Kolokoltsova T. 2005. Further development (MDCK) of live cold-adapted influenza vaccine: cultivation of vaccine strains in production fermenters. Vopr Virusol 50(2):4-9.

Genzel Y, Behrendt I, König S, Sann H, Reichl U. 2004. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. Vaccine 22:2202-2208.

Genzel Y, Ritter J, König S, Alt R, Reichl U. 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. Biotechnol Prog 21(1):58-69.

Genzel Y, Voges L, Reichl U. 2001. Development of Bioprocess Concepts on Vaccine Production: Influenza Virus as an Example. In: al. L-Oe, editor. Animal Cell Technologiy: From Target to Market: Kluwer Academic Publishers. p 344-346.

Giard D, Thilly W, Wang D, Levine D. 1977. Virus production with a newly developed microcarrier system. Appl Environ Microbiol 34(6):668-672.

Gilchrist M, Coombs D, Perelson A. 2004. Optimizing within-host viral fitness: infected cell lifespan and virion production rate. J Theor Biol 229(2):281-288.

Glacken MW, Adema E, Sinskey AJ. 1998. Mathematical description of hybridoma culture kinetics. 1. Initial metabolic rates. Biotechnol Bioeng 32:491-506.

Glacken MW, Fleischaker RJ, Sinskey AJ. 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. Biotechnol Bioeng 28:1376-1389.

Goergen J, Marc A, Engasser J. 1992. Comparison of specific rates of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous cultures. Cytotechnol 10(2):147-155.

Gooijer CDd, Koken RHM, Lier FLJvL, Kool M, Vlak JM, Tramper J. 1992. A Structured Dynamic Model for the Baculovirus Infection Process in Insect-Cell Reactor Configurations. Biotech Bioeng 40:537-548.

Goudar C, Joeris K, Konstantinov K, Piret J. 2005. Logistic equations effectively model Mammalian cell batch and fed-batch kinetics by logically constraining the fit. Biotechnol Prog 21(4):1109-1118.

Gould E, Clegg J. 1985. Growth, Assay and Purification of Alphaviruses and Flaviviruses. In: Mahy B, editor. Virology: A practical approach. Oxford: IRL Press. p 264.

Govorkova E, Fang H, Tan M, Webster R. 2004. Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells. Antimicrob Agents Chemother 48(12):4855-4863.
Govorkova E, Kodihalli S, Alymova I, Fanget B, RG W. 1999. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. Dev Biol Stand 98:39-51.
Govorkova E, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster R. 1996. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. J Virol 70(80):5519-5524.
Graziotti UA. 1962. Polyhedra: The Realm of Geometric Beauty. San Francisco: University of San Francisco.
Griffith JB, editor. 1999. Mammalian Cell Culture Reactors, Scale-Up. New York: Wiley-Interscience. 1594-1607 p.
Griffith JB. 2000. Animal Cell Products, Overview. In: Spier RE, editor. The Encyclopedia of Cell Technology. New York: Wiley-Interscience. p 70-76.
Gröhn P, Klöck G, Zimmermann U. 1997. Collagen-coated Ba(2+)-alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells. Biotechniques 22(5):970-975.
Guardia MJ, Gambhir A, Europa A, Hu W-S. 2000. Cybernetic modeling and regulation of metabolic pathways in multiple steady states of hybridoma cells. Biotechnol Prog 16(5):847-853.
Häggström L. 2000. Cell Metabolism, animal. In: Spier RE, editor. The Encyclopedia of Cell Technology. New York: Wiley-Interscience. p 392-411.
Harrison RG. 1907. Oberservations on the living developing nerve fiber. Proc Soc Exp Biol Med 4:140.
Hassel T, Gleave S, Butler M. 1991. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. Appl Biochem Biotechnol 30(1):29-41.
Hauser H, Wagner R. 1997. Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin: De Gruyter. 491 p.
Hawboldt KA, Kalogerakis N, Behie LA. 1994. A Cellular Automaton Model for Microcarrier Cultures. Biotechnol Bioeng 43:90-100.
Herrmann W, Lee J-H, Marinos G, Modi M, Zeuzem S. 2003. Effect of Ribavirin on Hepatits C Viral Kinetics in Patients Treated with Pegylated Interferon. Hepatology 37:1351-1358.
Herrmann W, Zeuzem S, Sarrazin C, Hinrchsen H, Benhamou J, Wedemeyer H, Steinmann G. 2004. Viral kinetics in patients with chronic hepatits C treated with the serine protease inhibitor BILN 2061. J Hepatol 40(1):24.
Hitzmann B, Broxtermann O, Cha Y-L, Sobieh O, Stärk E, Scheper T. 2000. The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by and extended Kalman filter. Bioprocess, Engng. 23(4):337-341.
Holl P, Marquardt W, Gilles E. 1988. DIVA - A powerful tool for dynamic process simulation. Comp Chem Eng 12:421-425.
Honda H, Kobayashi T. 2004. Industrial application of fuzzy control in bioprocesses. Adv Biochem Eng Biotechnol 87:151-171.
Hu W-S, Giard DJ, Wang DIC. 1985a. Serial Propagation of Mammalian Cells on Microcarriers. Biotechnol Bioeng 27:1466-1476.
Hu W-S, Meier J, Wang D. 1985b. A Mechanistic Analysis of the Inoculum Requirement for the Cultivation of Mammalian Cells on Microcarriers. Biotechnol Bioeng 27:585-595.
Jang J, Sanderson C, Chan L, Barford J, Reid S. 2000. Structured modeling of recombinant protein production in batch and fed-batch culture of baculovirus-infected insect cells. Cytotechnol 34:71-82.
Kärber G. 1931. Article on the collective handling of pharmacological array effort. Arch exp Path Pharmak 162:480-487.
Kato D, Takeuchi M, Sakurai T, Furukawa S, Mizokami H, Sakata M, Hirayama C, Kunitake M. 2003. The design of polymer microcarrier surfaces for enhanced cell growth. Biomaterials 24(23):4253-4264.
Kessler N, Thomas-Roche G, Gerentes L, Aymard M. 1999. Suitability of MDCK cells grown in serum-free medium for influenza virus production. Dev Biol Stand 98:13-21.
Kistner O, Barrett P, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. 1998. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Vaccine 16(9-10):960-968.
Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P. 1968. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. Cancer Res 28(7):1300-10.
Knipe D, Howley P, Griffin D. 2001. Fields´ virology Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins. 3087 p.

Köhler G, Milstein C. 2005. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.1975. J Immunol 174(5):2453-2455.

Köhler S, Räumschlüssel S, Zeitz M. Code Generator for Implementing Differential Algebraic Models Used in the Process Simulation Tool DIVA; 1997; Berlin. p 621-626.

Krogstad P, Uittenbogaart C, Dickover R, Bryson Y, Plaeger S, Garfinkel A. 1999. Primary HIV infection of infants: the effects of somatic growth on lymphocyte and virus dynamics. Clin Immunol 92(25-33).

Kröner A, Holl P, Marquardt W, Gilles E. 1990. DIVA - an open architecture for dynamic simulation. Comp Chem Eng 14:1289-1295.

Kuhn C, Vielkind U, Anders F. 1979. Cell cultures derived from embryos and melanoma of poeciliid fish. In Vitro 15(7):537-544.

Kurosawa H, Yasumoto K, Kimura T, Amano Y. 2002. Polyurethane membrane as an efficient immobilization carrier for high-density culture of rat hepatocytes in the fixed-bed reactor. Biotechnol Bioeng 70(20):160-166.

Kwon Y, Peng C. 2002. Calcium-alginate gel bead cross-linked with gelatin as microcarrier for anchorage-dependent cell culture. Biotechniques 33(1):212-214, 216, 218.

Kyung Y, Peshwa M, Gryte D, Hu W. 1994. High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements. Cytotechnol 14(3):183-190.

Lagarias J, Reeds J, Wright M, Wright P. 1998. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. SIAM J Opt 9(1):112-147.

Lavric V, Ofiteru I, Woinaroschy A. 2006. A sensitivity analysis of the fed-batch animal-cell bioreactor with respect to some control parameters. Biotechnol Appl Biochem 41(1):29-35.

Lee D, Piret J, Gregory D, Haddow D, Kilburn D. 1992. Polystyrene macroporous bead support for mammalian cell culture. Ann N Y Acad Sci 665:137-145.

Levine D, Wong J, Wang D, Thilly W. 1977. Microcarrier cell culture: new methods for research-scale application. Somatic Cell Genet 3(2):149-155.

Li L, Mi L, Feng Q, Liu R, Tang H, Xie L, Yu X, Chen Z. 2005. Increasing the culture efficiency of hybridoma cells by the use of integrated metabolic control of glucose and glutamine at low levels. Biotechnol Appl Biochem 42(Pt 1):73-80.

Licari P, Bailey J. 1992. Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: Optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. Biotech Bioeng 39(4):432-441.

Lim J, Davies G. 1990. A Stochastic Model to Simulate the Growth of Anchorage Dependent Cells on Flat Surfaces. Biotechnol Bioeng 36:547.

Lin C, Holland RJ, Donofrio J, McCoy M, Tudor L, Chambers T. 2002. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. Vet Microbiol 84(4):357-365.

Lindner E, Arvidsson A, Wergeland I, Billig D. 1987. Subpassaging cells on microcarriers: the importance for scaling up to production. Dev Biol Stand 66:299-305.

Linz M, Zeng AP, Wagner R, Deckwer WD. 1997. Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. Biotechnol Prog 13(4):453-63.

Lipatov A, Govorkova E, Webby R, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster R. 2004. Influenza: emergence and control. J Virol 78(17):8951-8959.

Lowy R. 2003. Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. Int Rev Immunol 22(5-6):425-449.

Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. 1999. A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell. Viral Immunol 12(3):175-196.

M´Kendrick AG, Pai MD. 1911. The Rate of Multiplication of Micro-organisms. Proc Roy Soc Edinburgh 31:649-655.

Mahy BWJ, Kangro H. 1996. Virology methods manual. London: Acad Press. 374 p.

Maranga L, Brazao T, Carrondo M. 2003. Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. Biotechnol Bioeng 84(2):245-253.

Maranga L, Rueda P, Antonis AF, Vela C, Langeveld JP, Casal JI, Carrondo MJ. 2002. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. Appl Microbiol Biotechnol 59(1):45-50.

Marquardt W. 1992. Rechnergestützte Erstellung verfahrenstechnischer Prozessmodelle. Chem Ing Tech 64:25-40.

Marquardt W, Gerstlauer A, Gilles E. Modeling and Representation of Complex Objects: A Chemical Engineering Perspective; 1993 June 1993; Edingburgh. p 1-10.

Massin P, Rodrigues P, Marasescu M, van der Werf S, Naffakh N. 2005. Cloning of the chicken RNA

polymerase I promoter and use for reverse genetics of influenza A viruses in avian cells. J Virol 79(21):13811-13816.
Mastrangelo A, Betenbaugh M. 1995. Implications and applications of apoptosis in cell culture. Curr Opin Biotechnol 6(2):198-202.
Mastrangelo A, Zou S, Hardwick J, Betenbaugh M. 1999. Antiapoptosis chemicals prolong productive lifetimes of mammalian cells upon Sindbis virus vector infection. Biotechnol Bioeng 65(3):298-305.
McDermott R, Butler M. 1993. Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine-free medium. J Cell Sci 104(Pt1):51-58.
Medley G, Lindop N, Edmunds W, Nokes D. 2001. Hepatitis-B virus endemicity: heterogeneity, catastrophic dynamics and control. Nat Med 7(5):619-624.
Meiners M. 1990. Biotechnologie für Ingenieure. Braunschweig: Vieweg. 352 p.
Merten O, Manuguerra J, Hannoun C, van der Werf S. 1999. Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. Dev Biol Stand 98:23-37.
Mittal R, Tan C, Khoo H. 2000. Adenosine modulates cell growth in baby hamster kidney (BHK) cells. Biofactors 11(4):247-256.
Möhler L, Flockerzi D, Sann H, Reichl U. 2005. Mathematical model of influenza A virus production in large-scale microcarrier culture. Biotechol Bioeng 90(1):46-58.
Monod J. 1942. Recherches sur la croissance des culture bacteriennes. Paris: Hermann et Cie.
Morenweiser R. 2005. Downstream processing of viral vectors and vaccines. Gene Ther 12(1):103-110.
Morgan SJ, Darling DC. 1994. Kultur tierischer Zellen. Hauk C, translator. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag. 220 p.
Munack A, Thoma M. 1986. Application of modern control for biotechnological processes. IEE Proc 133(D-5):194-197.
Muttzall K. 1994. Modellierung von Bioprozessen. Hamburg: Behr´s Verlag. 398 p.
Nadeau I, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 2000. 293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector. Biotechnol. Prog. 16:872-884.
Nagata Y, Chu K. 2003. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. Biotechnol Lett 25(21):1837-1842.
Nayak D, Lehmann S, Reichl U. 2005. Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 823(2):75-81.
Nayve FRP, Misato T, Matasumura M, Kataoka H. 1994. HBs-Mab production in perfusion culture with selective ammonia removal system. J Biotech 34:217-225.
Nelson P, Perelson A. 2002. Mathematical analysis of delay differential equation models of HIV-1 infection. Math Biosci 179(1):73-94.
Neumann G, Kawaoka Y. 2001. Reverse genetics of influenza virus. Virology 287(2):243-250.
Neva FA, Salk JE. 1955. Serial urinary Addis counts in patients inoculated repeatedly with poliomyelitis vaccine prepared from monkey kidney tissue cultures. J of Lab & Clin Med 46(1):24-27.
Nicholson K, Webster R, Hay A. 1998. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science. 578 p.
Nielsen J, Nikolajsen K, Villadsen J. 1991. Structured Modeling of a Microbial System: A Theoretical Study of Lactic Acid Fermentation. Biotechnol Bioeng 38:1-10.
Nielsen J, Nikolajsen K, Villadsen J. 1991. Structured Modeling of a Microbial System: II. Experimental Verification of a Structured Lactic Acid Fermentation Model. Biotechnol Bioeng 38:11-23.
Nielsen J, Nikolajsen K, Villadsen J. 1991. Structured Modeling of a Microbial System: III. Growth on Mixed Substrates. Biotechnol Bioeng 38:24-29.
Nielsen J, Villadsen J, Lidén G. 2003. Bioreaction Engineering Principles. New York: Kluwer Academic/Plenum. 528 p.
Nielsen L. 2000. Virus production from cell culture kinetics. In: Spier R, editor. Encyclopedia of cell technology. New York: John Wiley & Sons. p 1217-1230.
Nowak MA, May RM. 2000. Virus dynamics: The mathematical foundations of immunology and virology. Oxford: Oxford University Press. 237 p.
Nowak MA, May RM, Anderson R. 1990. The evolutionary dynamics of HIV-1quasispecies and the development of immunodeficiency disease. AIDS 4:1095-1103.
Nunes-Correia I, Ramalho-Santos J, Nir S, Pedroso de Lima MC. 1999. Interactions of Influenza Virus with Cultured Cells: Detailed Kinetic Modeling of Binding and Endocytosis. Biochem 38:1095-1101.
Omasa T, Higashiyama K-i, Shioya S, Suga K-i. 1992. Effects of Lactate Concentration on Hybridoma Culture in Lactate-Controlled Fed-Batch Operation. Biotech & Bioeng 39:556-564.
Otzturk S, Palsson B. 1990. Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of

Media Type, pH, and Serum Concentration. Biotechnol Prog 66(2):104-113.
Ozturk S. 1999. Ammonia Toxicity, Animal Cells. In: Flickinger M, Crew S, editors. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. New York: Wiley-Interscience. p 121-136.
Palache AM, Scheepers HS, de Regt V, van Ewijk P, Baljet M, Brands R, van Scharrenburg GJ. 1999. Safety, reactogenicity and immunogenicity of Madin Darby Canine Kidney cell-derived inactivated influenza subunit vaccine. A meta-analysis of clinical studies. Dev Biol Stand 98:115-25; discussion 133-4.
Palese P, Zheng H, Engelhardt O, Pleschka S, Garcia-Sastre A. 1996. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. Proc Natl Acad Sci U S A 93(21):11354-11358.
Pau M, Koldijk M, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. 2001. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. Vaccine 19:2716-2721.
Peleg M. 1997. Modeling microbial populations with the original and modified versions of the continuous and discrete logistic equations. Crit Rev Food Sci Nutr 37(5):471-490.
Perelson A, Nelson P. 1999. Mathematical Analysis of HIV-1 dynamics in vivo. SIAM Rev 41:3-44.
Petersen N, Riggs A, Seecof R. 1977. A method for establishing cell lines from Drosophila melanogaster embryos. In Vitro 13(1):36-40.
Pörtner R, Schäfer T. 1996a. Modelling Hybridoma Cell Growth and Metabolism - a Comparision of Selected Models and Data. J. of Biotech. 48:119-135.
Pörtner R, Schilling A, Ludemann I, Markl H. 1996b. High density fed-batch cultures for hybridoma cells performed with the aid of a kinetic model. Bioprocess Engineering 15(3):117-124.
Pörtner R, Schwabe J-O, Frahm B. 2004. Evaluation of selected control strategies for fed-batch cultures of hybridoma cell line. Biotechnol Appl Biochem 40:47-55.
Powers K, Dixit N, Ribero R. 2003. Modeling viral and drug kinetics: hepatitis C virus treatment with pergylated interferon alfa-2b. Semin Liver Dis 23(1):13-18.
Provost A, Bastin G. 2004. Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. J Proc Contr 14:717-728.
Reddy B, Yin J. 1999. Quantitative Intracellular Kinetics of HIV Type 1. Aids Research and Human Retroviruses 15(3):273-283.
Reichl U. ISCOM vaccines - antigen production and downstream processing; 2000; Stuttgart. Fraunhofer IRB Verlag. p 314-318.
Rimmelzwaan G, Baars M, Claas E, Osterhaus A. 1998. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. J Virol Methods 74(1):57-66.
Robertson J, Cook P, Attwell A, Williams S. 1995. Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. Vaccine 13(16):1583-1588.
Roels J. 1983. Energetics and Kinetics in Biotechnology. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. 330 p.
Roitt I, Brodstoff J, Male D. 1989. Immunology. London: Gower Medical. 480 p.
Ronning O, Schartum M, Winsnes A, Lindberg G. 1991. Growth limitation in hybridoma cell cultures: the role of inhibitory or toxic metabolites. Cytotechnol 7(1):15-24.
Roy A, Carroll M, Kass D, Nguyen S, Salem A, Batzer M, Deininger P. 2000. Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamin. Virology 267(1-3):149-161.
Ruaan R-C, Tsai G-J, Tsao G. 1993. Monitoring and modeling density-dependent growth of anchorage-dependent cells. Biotechnol Bioeng 41:380-389.
Schlosser PM, Bailey JE. 1990. An Integrated Modeling Experimental Strategy for the Analysis of Metabolic Pathways. Math Biosc 100:87-114.
Schmid G, Keller T. 1992. Monitoring Hybridoma Metabolism in Continuous Suspension Culture at the Inracellular Level. Cytotechnology 9:217-229.
Schubert J, Simutis R, Dors M, Havlik I, Lübbert A. 1994. Hybrid Modeling of Yeast Production Processes - Combination of a-Priori Knowledge on Different Levels of Sophistication. Chemical Engineering & Technology 17(1):10-20.
Schügerl K. 2001. Progress in Monitoring, Modeling and Control of Bioprocesses During the last 20 Years. J Biotechnol 85:149-173.
Seber GAF, Wild CJ. 1989. Nonlinear Regression. New York: Wiley.
Shuler ML, Domach M. 1983. Mathematical Models of the Growth of Individual Cells. Ithaka, New York: School of Chemical Engineering, Cornell University. 93-133 p.
Sidorenko Y, Reichl U. 2004. Structured Model of Influenza Virus Replication in MDCK Cells. Biotechnol Bioeng 88:1-14.

Sigmon K. 1993. MATLAB Primer. Gainesville, FL: Department of Mathematics, University of Forida.
Simutis R, Havlik I, Lübbert A. 1993. Fuzzy aided neural network for real time state setimation and process prediction in a production scale beer fermentation. J Biotechnol 27:230-215.
Smith GL. 1994. Large-Scale Animal Cell Culture. In: Lydersen BK, D´Elia NA, Nelson KL, editors. Bioprocess Engineering: Systems, Equipment and Facilities. New York: John Wiley & Sons, Inc. p 69-84.
Sonnleitner B, Locher G, Fiechter A. 1992. Minireview: Biomassdetermination. J Biotechnol 25:5-22.
Spearman C. 1908. The method of right and wrong cases (‘constant stimuli’) without Gauss' formulae. Brit J Psychol 2:227-242.
Swiniarski R, Lesniewski A, Dewshi M, Ng M, Leigh J. Progress Towards Estimation of Biomass in a Batch Fermentation Process; 1982; Helsinki. IFAC. p 231-242.
Teixeira A, Cunha A, Clemente J, Moreira J, Cruz H, Alves P, Carrondo M, Oliveira R. 2005. Modelling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems. J Biotechnol 118(3):290-303.
Tränkle F, Gerstlauer A, Zeits M, Gilles E. PROMOT/DIVA: A Prototype of a Process Modeling and Simulation Environment. In: Troch I, Breitenecker F, editors; 1997; Vienna. TU Vienna, Austria. p 341-346.
Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. 2001. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine 19:3444-3450.
Tsao G, Hansen T. 1975. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. Biotechnol Bioeng 17:1591-1598.
Tumpey T, Basler C, Aguilar P, Zeng H, Solorzano A, Swayne D, Cox N, Katz J, Taubenberger J, Palese P and others. 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science 310(5745):77-80.
Tziampazis E, Sambanis A. 1994. Modeling of cell culture processes. Cytotechnol 14:191-204.
Überhuber C, Katzenbeisser S, Praetorius D. 2005. Matlab 7. Wien: Springer Verlag. 307 p.
Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Toyoda H. 2005. Inhibition of influenza-virus-induced apoptosis in chorion cells of human fetal membranes by nordihydroguaiaretic Acid. Intervirology 48(5):336-340.
van Wezel A. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. Nature 216(110):64-65.
Vernet T, Lau PC, Narang SA, Visentin LP. 1985. A direct-selection vector derived from pColE3-CA38 and adapted for foreign gene expression. Gene 34(1):87-93.
Volesky B, Votruba J. 1992. Modeling and Optimization of Fermentation Processes. New York: Elsevier Science Pub Co. 266 p.
Vriezen N, van Dijken J, Häggström L. 2001. Mammalian Cell Culture. In: Ratledge C, Kristiansen B, editors. Basic Biotechnology. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press. p 449-470.
Werner R, Noe W. 1993. Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism. Arzneimittelforschung 43(10):1134-1139.
Wodarz D, Christensen J, Thomsen A. 2002. The importance of lytic and nonlytic immune responses in viral infections. Trends Immunol 23(4):194-200.
Wu S, Liu C, Lian W. 2004. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. Vaccine 22(29-30):3858-3864.
Xie LZ, Wank DI. 1994. Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth ad its Application in Medium Design. Biotechnol Bioeng 43(11):1164-1174.
Yokomizo A, Antoniazzi M, Galdino P, Azambuja Nj, Jorge S, Pereira C. 2004. Rabies Virus Production in High Vero Cell Density Cultures on Macroporous Microcarriers. Biotechnol Bioeng 85(5):506-514.
Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. 2005. Influenza Virus PB1-F2 Protein Induces Cell Death through Mitochondrial ANT3 and VDAC1. PLoS Pathog 1(1):e4.
Zhang S, Chu J, Zhuang Y. 2004. A multi-scale study of industrial fermentation processes and their optimization. Adv Biochem Eng Biotechnol 87:97-150.
Zhao S, Xu Z, Lu Y. 2000. A mathematical model of hepatitis B virus transmission and its application for vaccination strategy in china. Int J Epidemiol 29(4):744-752.
Zielke H, Zielke C, Ozand P. 1984. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. Fed Proc 43(1):121-125.
Zygourakis K, Markenscoff P, Bizios R. 1991. Proliferation of anchorage-dependent contact-inhibited cells. II. Experimental results and validation of the theoretical models. Biotechnol Bioeng 38:471.

Anhang

A1: Diskretisierung der limitierenden Oberfläche eines Microcarriers

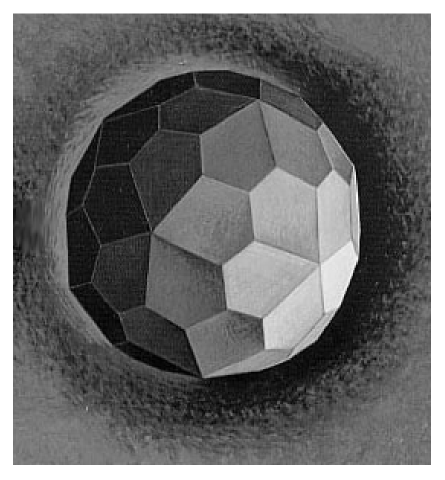

Abbildung A1: Räumliche Darstellung eines pentagonalen Hexacontrahedrons (60-Flach). Jede der 60 unregelmäßigen Flächen besitzt Grenzen zu je 5 Nachbarflächen.

A2: Erläuterungen zur Verwendung der Heavysidefunktion

Die Sättigungsfunktion $\sigma(S)$ wird in der Biologie hauptsächlich über den exponentiellen Ansatz

$$\sigma(S) = \frac{1}{1+e^{-S}} \tag{A1}$$

beschrieben. Zur Erhöhung der Flankensteilheit kann ein Faktor a eingeführt werden. Um die Funktion in den Grenzen von 0 bis 1 laufen zu lassen wird sie auf der Ordinate um 0,5 verschoben und mit einem Faktor von 2 skaliert

$$\sigma(S) = 2 \cdot \left(\frac{1}{1+e^{-a \cdot S}} + \tfrac{1}{2} \right) \tag{A2}$$

Zur Modellierung wird diese Funktion mit der Sprungantwort $\sigma(S) = \begin{cases} 1 \text{ für S} > 0 \\ 0 \text{ für S} = 0 \end{cases}$

(Heavysidefunktion) implementiert.

A3: Bestimmung von k_{dQ}

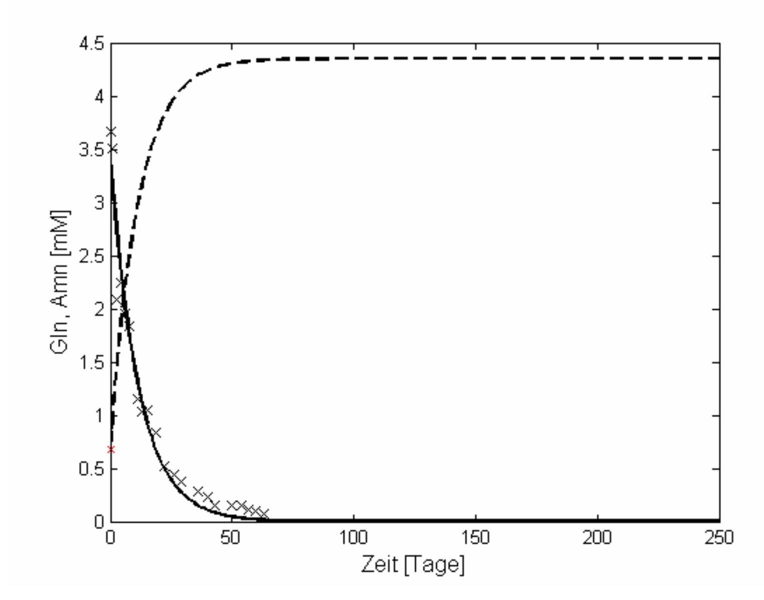

Abbildung A2: Experiment zur Glutaminstabilität, Messwerte (x) und Ergebnisse einer nichtlinearen Regression (—). Verlauf der Simulation der Ammoniumkonzentration zum Vergleich (- - -).

Das Ergebnis der nichlinearen Regression an eine Zerfallskinetik erster Ordnung liefert für k_{dQ} einen Wert von 0,0036 h^{-1} bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,3 in GMEM.

A4: Experimente zur Bestimmung von k_{at}, k_{det}, k_d und k_{lys}.

Bestimmung von k_{at}

In einem Einzelexperiment werden Zellen im Rührkesselreaktor in Wachstumsmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Zellen in Suspension und abgelöste Zellen von Microcarriern werden separat unter Verwendung einer Trypanblaufärbung in einem Haemacytometer bestimmt. Die Attachmentrate wird mittels Optimierung (nonlinear least square curve fit) anhand der Modellgleichung

$$X_{Sus} = X_{Sus,0} \cdot e^{-k_{at} \cdot t} \tag{A3}$$

vorgenommen. Es ergibt sich für $k_{at} = 0{,}19\ h^{-1}$ (Abbildung A3).

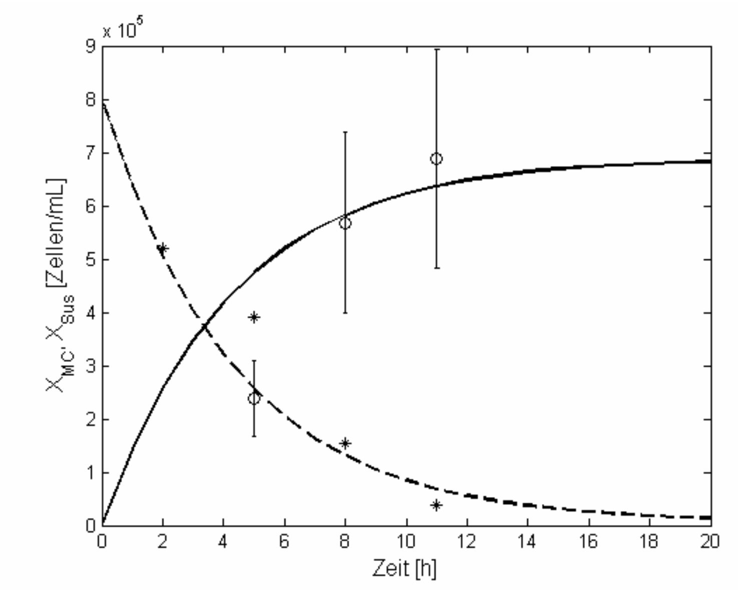

Abbildung A3: Kultivierungen in Wachstumsmedium unter Standardbedingungen. Darstellung von Zellen in Suspension (X_{Sus}, blau) und Zellen auf Microcarriern (X_{MC}, schwarz) mit relativem Fehler von 30 %. Die Linien stellen die Simulationsergebnisse für $k_{at} = 0{,}19\ h^{-1}$ dar.

Bestimmung von k_d und k_{lys}.

In 3 Einzelexperimenten werden Zellen in Rührkesselreaktoren in Wachstumsmedium unter Standardbedingungen, jedoch ohne Zugabe von Carriern kultiviert. Zellen in Suspension und tote Zellen werden unter Verwendung einer Trypanblaufärbung in einem Haemacytometer bestimmt. Die Todesrate und Lyserate werden mittels Optimierung (nonlinear least square curve fit) anhand der Modellgleichungen

$$\dot{X}_{Sus} = -k_d \cdot X_{Sus} \tag{A4}$$

$$\dot{X}_d = k_d \cdot X_{Sus} - k_{lys} \cdot X_d \tag{A5}$$

vorgenommen. Es ergibt sich für $k_d = 0{,}07\ h^{-1}$, für $k_{lys} = 0{,}35\ h^{-1}$(Abbildung A4).

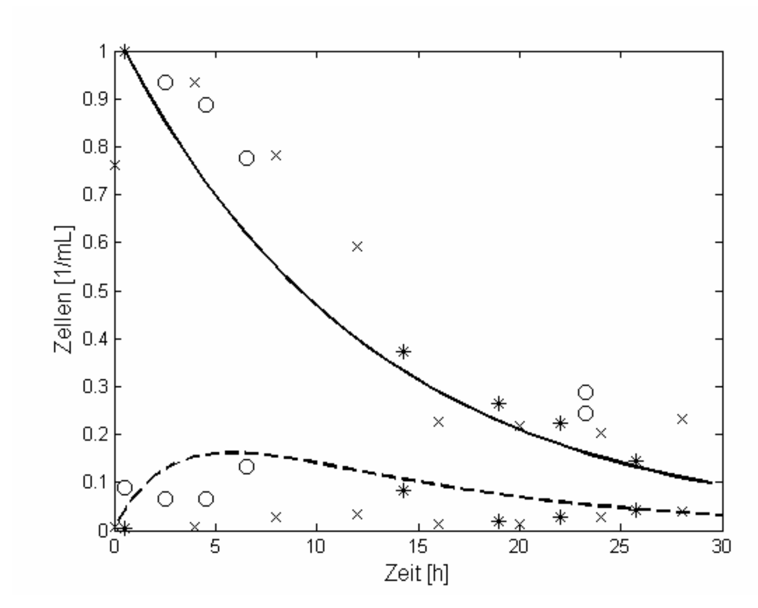

Abbildung A4: Datenreihen von 3 unabhängigen Kultivierungen (x,o,✳) in Wachstumsmedium ohne Carrier unter Standardbedingungen. Normierte Darstellung von Zellen in Suspension (X_{Sus}, —) und toten Zellen (X_d, ---). Linien stellen Simulationsergebnis mit optimierten Parameterwerten dar.

Bestimmung von k_{det}

Es wird abgeschätzt, dass etwa 1 % der sich während der Kultivierung an die Carrier anheftenden Zellen wieder ablösen und k_{det} zu 0,002 h^{-1} angenommen.

A5: Bestimmung von μ_{max}

Anhand der exponentiellen Wachstumsphasen der Fermentationen F56, F70 und F86 (Tabelle A6) wird aus der Steigung der logarithmierten Zellzahlen auf Microcarriern und Mittelwertbildung ein Wert von μ_{max} = 0,046 h^{-1} erhalten.

A6: Vergleich der Mittelwerte der individuellen Parametersätze des Attachment Modells mit Literaturwerten

Tabelle A1: Mittelwert und Standardabweichung (%) der im Attachment Modell verwendeten Modellparameter

Name	Einheit	F56	F70	F86	Mittelwert	relativer Standardfehler (%)	Literatur
Y_{glc}	$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$	0,05	0,77	0,07	0,30	138,22	0,3…1,7 [1]
Y_{gln}	$10^9 \frac{Zellen}{mmol}$	1,02	5,45	0,79	2,42	108,56	0,5…1,4 [1]
k_{glc}	$\frac{mmol}{L}$	0,40	0,40	0,40	0,40	0,00	0,40 [2]
k_{gln}	$\frac{mmol}{L}$	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00	0,14 [2]
k_{lac}	$\frac{mmol}{L}$	50	50	50	50	0,00	50 [3]
k_{amn}	$\frac{mmol}{L}$	10	10	10	10	0,00	10 [4]
α_{lac}	$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$	28,40	14,10	30,20	24,23	36,40	2,10 [5]
α_{amn}	$10^{-9} \frac{mmol}{Zelle}$	0,95	0,48	0,67	0,70	34,11	0,51 [5]
k_{dQ}	h^{-1}	0,0019	0,0019	0,0019	0,0019	0,00	
μ_{max}	h^{-1}	0,0509	0,1096	0,0567	0,0724	44,68	0,05…0,062 [5,6]
k_d	h^{-1}	0,0700	0,0700	0,0700	0,0700	0,00	0,07 [5]
k_{at}	h^{-1}	0,0845	0,0083	0,0089	0,0339	129,27	
k_{det}	h^{-1}	0,0032	0,0015	0,0014	0,0020	49,75	
k_{lys}	h^{-1}	0,3500	0,3500	0,3500	0,3500	0,00	
$k_{i,Lac}$	$\frac{L}{mol}$	8,95	1,02	1,05	2,98	173,18	14 [7]
$k_{i,Amn}$	$\frac{L}{mol}$	2,96	2,20	3,58	1,84	72,74	50 [7]
m_{Glc}	$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle h}$	0,05	2,16	1,04	1,08	97,26	0,5 [6]
m_{Gln}	$10^{-10} \frac{mmol}{Zelle h}$	0,02	0,09	0,06	0,06	67,13	0,11…0,38 [4]
X_{max}	$10^6 \frac{Zellen}{mL}$	1,60	1,60	1,60	1,60	0,00	

[1] Häggström (2000), Hybridoma, Myeloma
[2] Cruz (1999), BHK
[3] Glacken et al. (1988), Hybridoma
[4] Glacken et al. (1986), MDCK
[5] Biener (1998), Hybridoma, CHO
[6] Miller (1988), Hybridoma
[7] Doyle & Griffith (1998), Hybridoma

A7: Bestimmung der Wachstumsrate für das Virusmodell.

Anhand der Daten des Zellwachstums der F33 wird die Wachstumsrate aus dem Intervall des exponentiellen Wachstums unter Standardbedingungen bestimmt. Aus dem logarithmischen Plot der Daten und linearer Regression lässt sich der Wert der spezifischen Wachstumsrate zu μ_{max} = 0,03 h^{-1} abschätzen (Tabelle A6).

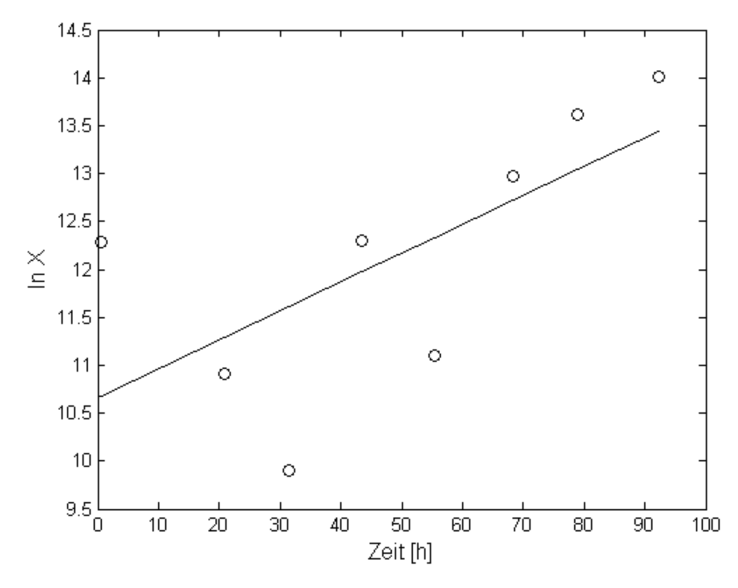

Abbildung A5: Logarithmische Auftragung der Zellen X der exponentiellen Wachstumsphase über der Zeit (o). Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} aus der Steigung der linearen Regression (—).

A8: Abhängigkeit von X_o und X_{max} bei gleich bleibender MOI

Tabelle A2: Abhängigkeit des Maximums des Virusertrages und seinen Zeitpunktes von Startzellzahl X_0 und Platz auf Microcarriern X_{max}.

Variation von X_0 und X_{max}	[10^6 Zellen/mL]	Virus [10^{10} Partikel/mL]	Zeitpunkt des Maximums
X_0=0,6·10^5	X_{max}=0,8	V_{max}=0,63	84,23 h
	X_{max}=1,6	V_{max}=0,65	81,93 h
X_0=1,2·10^5	X_{max}=1,6	V_{max}=1,27	78,24 h
X_0=2,4·10^5	X_{max}=1,6	V_{max}=2,39	77,89 h
	X_{max}=3,2	V_{max}=2,52	74,97 h

A9: Bestimmung der Anzahl der Viruspartikel aus dem Haemagglutinations Test (HA-Test)

Der HA-Test ist eine indirekte Methode zur Quantifizierung von Influenza-Viruspartikeln in Suspension. Dabei unterscheidet der HA-Test nicht zwischen infektiösen und nicht-infektösen Viruspartikeln und ist kein sehr sensitives Assay Die HA-Oberflächenproteine sind für die Anlagerung des Virus an die N-Acetylneuraminsäurereste, die auf der Erythrozytenmembran präsentiert werden, verantwortlich. Um eine Agglutination zu erzielen, muss mindestens ein Virus gleichzeitig zwei Erythrozyten binden.

Der HA-Test wird in 96 Well Platten mit rundem Boden durchgeführt. Bei einem Überschuss von Erythrozyten ist die Menge von quervernetzten Erythrozyten minimal. Die Erythrozyten fallen zu Boden, rutschen in die Mitte des Wells und formen ein kleines, klar definiertes Pellet. Bei einer ausreichend hohen Viruskonzentration werden Aggregate von quervernetzten Erythrozyten gebildet, die nicht in die Mitte des Wells rutschen, sie formen ein gleichmäßiges dünnes Gitter am Boden. Der HA-Test wird als Endpunkttitration durchgeführt.

In die zweite bis zwölfte Vertiefung aller Reihen der 96 Well Platte werden zunächst 100 µL PBS vorgelegt. In der ersten Reihe werden 3 Vertiefungen für die Negativkontrolle benutzt, hier werden zu dem vorgelegten PBS 100 µL Erythrozytengebrauchslösung pipettiert. In der zweiten Reihe wird die Titerbestimmung des Standards durchgeführt (Positivkontrolle) und in den Reihen 3 bis 8 wird die Titerbestimmung der Proben durchgeführt. In die erste Vertiefung der Reihe 2 wird unverdünnter Virusstandard pipettiert, in die zweite Vertiefung werden 100 µL Standard zu den vorgelegten 100 µL PBS gegeben, durch mehrmaliges Pipettieren wird gemischt, dann werden 100 µL überführt in die nächste Vertiefung überführt. Die 1:2 Verdünnungsreihe wird über alle 12 Vertiefungen weitergeführt, aus der 12. Vertiefung werden 100 µL verworfen. Mit den Proben wird in den Reihen 3 bis 8 genauso verfahren. Die Verdünnungsreihe wird mit einer 8-Kanal-Pipette durchgeführt. Nachdem alle Proben verdünnt wurden, wird in jedes well mit einer Multipipette 100 µL Erythrozytengebrauchslösung pipettiert. Die Platte wird bei Raumtemperatur 60 bis 90 min inkubiert, danach kann der Titer bestimmt werden.

Die Titerbestimmung wird mit bloßem Auge vorgenommen werden. Bei ausreichender Viruskonzentration in einem Well werden die Erythrozyten vernetzt und es ist eine gleichmäßige rote Färbung zu sehen. Reicht der vorhandene Virus nicht zur Quervernetzung der Erythrozyten aus, sinken diese auf den Boden und bilden einen sogenannten Erythrozytenknopf. Ist ein vollständiger Erythrozytenknopf in einem Well zu erkennen, so ist dies der erste negative Wert, d. h. es ist nicht mehr ausreichend Virus vorhanden um zu einer Quervernetzung zu führen. Ist der Knopf nur teilweise vorhanden so wird dies noch als positiv, d.h. ausreichend Virus vorhanden, gewertet. Die letzte Vertiefung vor einem vollständigen Knopf zeigt den HA-Wert der jeweiligen Probe an. Zunächst wird der HA des Standards ermittelt. Weicht der Wert des Standards vom angegebenen Wert ab, so werden auch alle folgenden Ergebnisse der Platte um die Abweichung nach oben oder unten korrigiert. Die Genauigkeit des Test liegt bei einer log Stufe.

Tabelle A3: Verdünnungsstufen und entsprechende log HA Einheiten/100 µL

0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	**Verdünnung**
0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0	3,3	**log HA units/100 µL**

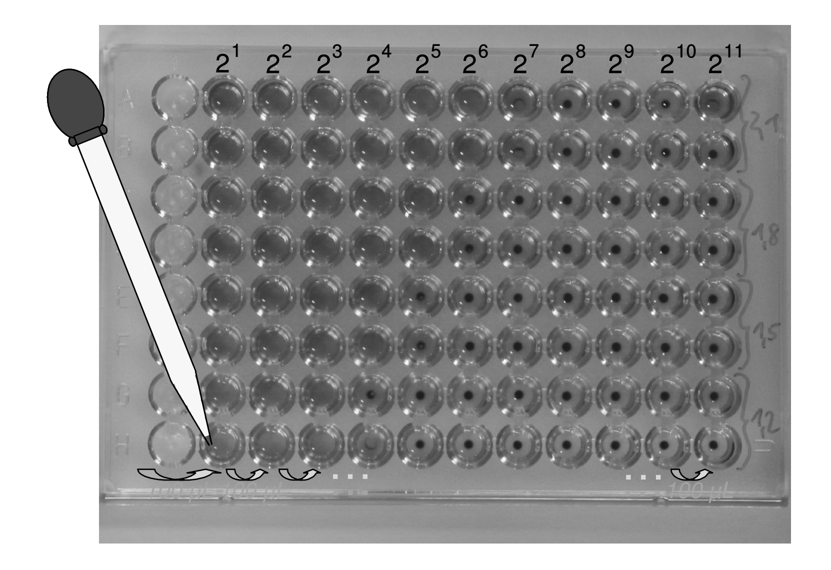

Abbildung A6: Bestimmung des HA Titers anhand Spotbildung in der Mikrotiterplatte: Exemplarische Vorlage der Titer 1,2 bis 2,1 HA log Einheiten/100 µL

Bei genau bekannter Anzahl der Erythrozyten pro Loch der Mikrotiterplatte und Kenntnis des Verhältnisses von Viruspartikeln (*V*) zu Erythrozyten (*Z*), das vorhanden sein muss, um die Blutkörperchen in Schwebe zu halten, kann die Anzahl der Viruspartikel für jede Verdünnungsstufe nach

$$n_{Virus} = \frac{V}{Z} \cdot c_{RBC} \cdot F \qquad \text{(A5)}$$

mit n_{Virus} = Anzahl der Viruspartikel [mL^{-1}], V = mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmte Anzahl von Viruspartikeln, Z = Anzahl von Erythrozyten, c_{RBC} = Konzentration der roten Blutkörperchen [mL-1], F = bestimmte Verdünnungsstufe des Virus im HA Test (log HA/100 µL].

berechnet werden. Die Konzentration der Erythrozyten ist festgelegt zu $c_{RBC} = 2{,}03 \cdot 10^7$ Zellen/mL.

Das Verhältnis der Anzahl nötiger Viruspartikel zu Erythrozyten wurde von Dr. Heiner Sann nach folgender Methode bestimmt: Zur Zählung der Viruspartikel und Erythrocyten im Probevolumen mit fluoreszensmirkoskopischen Aufnahmen wird eine Färbung der Partikel durchgeführt, die aus 8 identischen, unabhängigen HA-Tests bei Raumtemperatur in einer 96 Well Mikrotiterplatte stammen. Erythrocyten und Virus werden resuspendiert und mit 1 % Formaldehyd (Parafomaldehyd Sigma #P-6148 oder Glutaraldehyd, Sigma #G-5882) zur Mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) in PBS bei 4 °C über Nacht fixiert und gewaschen mit PBS (2 % Glycin, Merck #1.04169.1000; 1 g/L BSA, Sigma #A-3912). Es schließt sich eine Markierung mit Antiserum (Ziege) gegen Influenza Virus (Nanotools 613#1, 02.08.2001) an. Nach mehreren Waschschritten mit PBS werden die Viruspartikel weiterhin mit einem sekundären fluoreszenzkonjugierten Antikörper (Alexa 488, Molecular Probes, Eugene, OR) inkubiert. Zur Auszählung der Erythrocyten und Viruspartikel werden Bilder mit einem LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, 20x) aufgenommen (Abbildung A7). Das Ergebnis der Auszählungen ist in Tabelle A4 zusammengestellt. Bei Verdoppelung der Verdünnungsstufe ergibt sich ebenfalls eine Verdoppelung des Verhältnisses $\frac{V}{Z}$.

Tabelle A4: Berechnung der Konzentration der Influenza A Viruspartikel anhand gezählter Fluoreszenspunkte auf Erythryocyten. Mit freundlicher Genehmigung Dr. H. Sann

c_{RBC} [mL^{-1}]	F	V	Z	V/Z	n_{Virus} [Partikel/mL]
$2{,}03 \cdot 10^7$	256	467	121	3,86	$2{,}006 \cdot 10^{10}$
$2{,}03 \cdot 10^7$	512	235	120	1,96	$2{,}036 \cdot 10^{10}$
$2{,}03 \cdot 10^7$	1024	119	112	1,06	$2{,}208 \cdot 10^{10}$

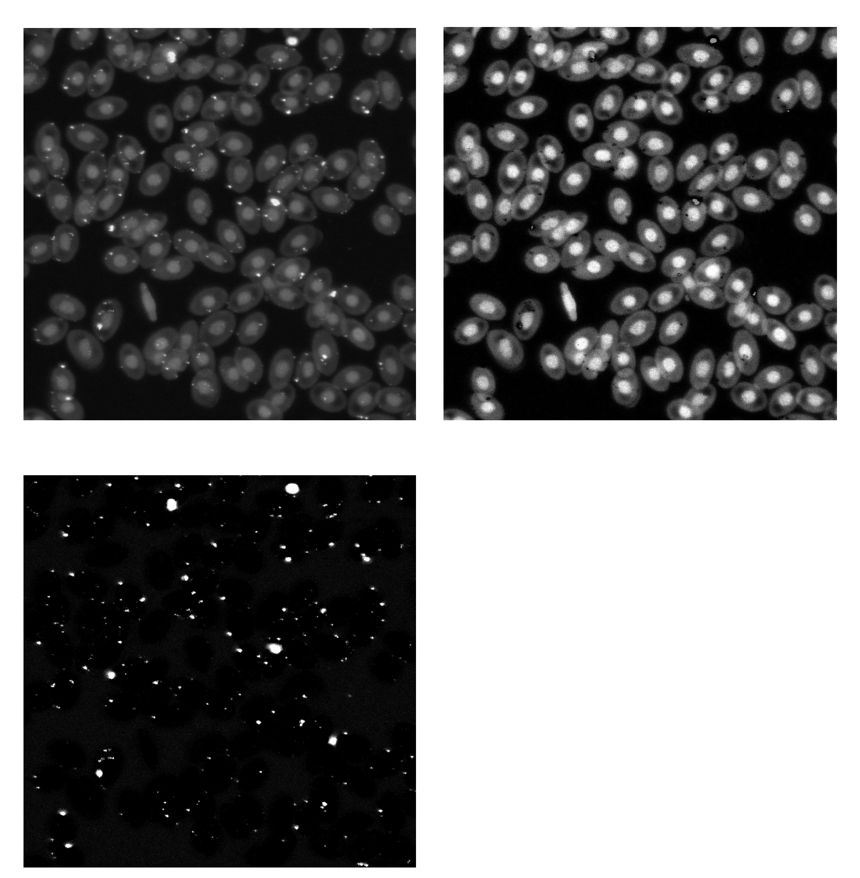

Abbildung A7 a) – c): Erythrocyten und fluoreszensmarkierte Viruspartikel: a) Zweikanaldarstellung, b) Kanaldifferenz zur Darstellung der Erythrozyten, c) Kanaldifferenz zur Darstellung der Viruspartikel. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Sann.

Die Konzentration der Viruspartikel lässt sich berechnen durch

$$n = 2 \cdot 2{,}03 \cdot 10^{7} \cdot 10^{HA} \qquad \text{(A6).}$$

mit n = Anzahl der Viruspartikel [mL^{-1}]

A10: Verschiebung des Erntezeitpunktes bei Verlängerung der Produktionszeit durch kleinere Apoptoserate

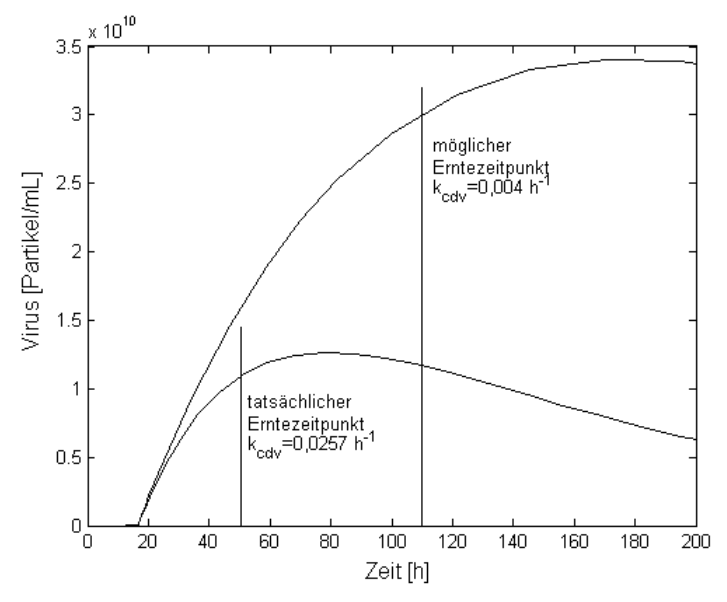

Abbildung A8: Verschiebung des Erntezeitpunktes bei Verlängerung der Produktionszeit durch kleinere Apoptoserate (von k_{cdv} = 0,0257 h^{-1} auf k_{cdv} = 0,004 h^{-1}, optimierter Parametersatz) bei Ernte von etwa 85 % des erreichbaren Maximalwertes der Virusausbeute.

Zum hypothetischen Erntezeitpunkt t = 50 h der Simulation, entsprechend des Erntezeitpunkts nach zwei Tagen im Experiment, werden etwa 85 % des Maximalwertes der Virusausbeute erreicht, der in der Simulation zum Zeitpunkt t = 80 h eintritt. Bei verringerter Sterberate aufgrund der Virusinfektion (k_{cdv}) ergibt sich bei Abschätzung des 85 % Wertes der maximalen Virusausbeute ein möglicher Erntezeitpunkt von t = 110 h. Das Maximum in der Simulation wird in diesem Fall nach etwa 170 h erreicht.

Tabelle A5: Rohdaten der Fermentationen F56, F70, F86

Fermentation F56

	time	time after infect	Glucose	Glucose	Lactate	Lactate	Ammonia	Ammonia	Glutamine	Glutamine	Glutamate	Glutamate	Alanine	Proline	Asparagine	HA (MW Dop	alive Supernatant Cell Number	dead Supernatant Cell Number	total Supernatant In Cell Numbe	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number
	h	h	g / L	mmol / L	g / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mmol / L	mmol / L	mmol / L	log units	x 10^5 / mL	/ mL		x 10^5 / mL	/ mL	log
F56/01	0,00		4,94	27,42	0,15	1,71	6,81	0,40	243	1,7	38	0,26	0,32	0,20	0,05		2,6	0	#ZAHL!	0		
F56/2	1,00		4,87	27,03	0,20	2,21	6,81	0,40	233	1,6	44	0,30	0,37	0,34	0,06		2,25	0,2	-1,61	0,15	150000,00	11,92
F56/3	7,75				0,21	2,39	7,66	0,45	218	1,5	42	0,29	0,39	0,41	0,06		0,1	0,05	-3,00	1,8	1800000,00	14,40
F56/4	20,00		4,49	24,92	0,38	4,29	10,05	0,59	211	1,4	59	0,40	0,46	0,58	0,08		0,05	0,15	-1,90	1,9	1900000,00	14,46
F56/5	31,50		4,08	22,64	0,61	6,86	12,60	0,74	185	1,3	56	0,38	0,51	0,64	0,07		0,1	0,05	-3,00	3,8	3800000,00	15,15
F56/6	44,00		3,82	21,20	1,05	11,79	16,86	0,99	166	1,1	55	0,37	0,70	0,69	0,07		0	0,15	-1,90	4	4000000,00	15,20
F56/7	54,50		3,21	17,82	1,55	17,41	20,27	1,19	132	0,9	35	0,24	0,87	0,69	0,07		0,15	0,1	-2,30	6	6000000,00	15,61
F56/8	67,50		2,10	11,66	2,42	27,18	24,69	1,45	85	0,6	2	0,01	1,01	0,63	0,05		0,2	0,1	-2,30	10,5	##########	16,17
F56/9	78,50		1,12	6,22	3,49	39,19	28,44	1,67	49	0,3	4	0,03	1,14	0,64	0,03		0,1	0,1	-2,30	11,5	##########	16,26
F56/02	96,50		5,90	32,75	0,00	0,04	5,11	0,30	303	2,1	26	0,18	0,24	0,11	0,05	0,00						
F56/11	97,50	1,00	4,19	23,25	0,12	1,29	4,26	0,25	220	1,5	18	0,12	0,21	0,09	0,04	0,00	10,10	1,01E+06	13,83	10,10		
F56/12	116,00	19,50	2,97	16,48	1,43	16,06	11,24	0,66	161	1,1	14	0,10	0,66	0,17	0,07	1,95				5,36		
F56/13	127,00	30,50	2,55	14,15	1,74	19,54	14,82	0,87	139	1,0	52	0,35	0,83	0,26	0,11	1,95				3,68		
F56/14	140,25	43,75	2,26	12,54	2,01	22,57	17,88	1,05	124	0,8	92	0,63	0,87	0,38	0,14	2,25				2,34		
F56/15	152,50	56,00	2,22	12,32	2,00	22,46	20,27	1,19	109	0,7	104	0,71	0,99	0,53	0,16	2,25				1,54		
F56/16	165,00	68,50	2,17	12,04	2,17	24,37	21,63	1,27	103	0,7	115	0,78	0,98	0,53	0,18	2,25				1,00		

0,043 growth rate

Fermentation F70

	time	time after infect	Glucose	Glucose	Lactate	Lactate	Ammonia	Ammonia	Glutamine	Glutamine	Glutamate	Glutamate	Alanine	Proline	Aspartat	HA (MW Dop	alive Supernatant Cell Number	dead Supernatant Cell Number	total Supernatant Cell Number	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number
	h	h	g / L	mmol / L	g / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mmol / L	mmol / L	mmol / L	log units	x 10^5 / ml	x 10^5 / mL	x 10^5 / mL	x 10^5 / mL	/ mL	log
70/0	0,00																					
70/01	1,75		5,00	27,72	0,15	1,72	9,03	0,53	209	1,43	69	0,47	0,09	0,10	0,03		2,4	0,1	2,5			
70/1	14,75		4,73	26,25	0,22	2,52	11,41	0,67	188	1,29	71	0,48	0,05	0,18	0,04		1,7	0,65	2,35	0,45	4,50E+04	10,71
70/2	26,00		4,91	27,25	0,37	4,16	14,82	0,87	163	1,11	67	0,46	0,13				1,3	0,5	1,8	0,7	7,00E+04	11,16
70/3	39,00		4,57	25,36	0,61	6,88	16,69	0,98	172	1,18	80	0,54	0,16	0,21	0,05		0,25	0,3	0,55	5,2	5,20E+05	13,16
70/4	49,25		4,27	23,70	0,99	11,08	18,73	1,10	186	1,27	77	0,52	0,23	0,30	0,04		0,15	0,25	0,4	6,3	6,30E+05	13,35
70/5	63,50		3,22	17,87	1,78	19,99	21,63	1,27	128	0,87	51	0,35					0,25	0,5	0,75	11,2	1,12E+06	13,93
70/6	74,75		2,43	13,46	2,65	29,70	26,06	1,53	112	0,76	31	0,21	0,29	0,34	0,03		0,15	0,4	0,55	14,3	1,43E+06	14,17
70/7	88,25		1,21	6,69	3,50	39,25	30,82	1,81	49	0,34	14	0,10	0,38	0,27	0,02		0,15	0,7	0,85			
70/8	98,75	8,75	4,61	25,56	0,90	10,06	11,41	0,67	261	1,78	44	0,30	0,30	0,05	0,09	0,3	0,2	0,05	0,25			
70/9	110,00	19,75	3,56	19,73	1,73	19,43	17,88	1,05	200	1,37	39	0,26	0,51		0,06	1,8	0,10	1,90	2			
70/10	121,75	31,50	3,16	17,54	2,14	23,98	22,31	1,31	194	1,33	57	0,38	0,61	0,11	0,11	2,10	0,45	3,95	4,4			
70/11	133,75	43,50	2,91	16,15	2,35	26,39	26,23	1,54	166	1,14	84	0,57	0,70	0,22		2,40	0,20	6,40	6,6			
70/12	145,75	55,50	2,53	14,01	2,21	24,82	24,52	1,44	149	1,02	88	0,60	0,68	0,27	0,17	2,40	0,50	12,80	13,3			
70/13	158,25	68,00	2,60	14,43	2,54	28,52	28,95	1,70	157	1,07	107	0,72	0,92	0,35	0,19	2,40	1,05					

0,061 growth rate

Fermentation F86

	time	time after infect	Glucose	Glucose	Lactate	Lactate	Ammonia	Ammonia	Glutamine	Glutamine	Glutamate	Glutamate	Alanine	Proline		HA (MW Dop	alive Supernatant Cell Number	dead Supernatant Cell Number	total Supernatant Cell Number	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number	Carrier Cell Number
	h	h	g / L	mmol / L	g / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mg / L	mmol / L	mmol / L	mmol / L		log units	x 10^5 /ml	x 10^5 /ml	x 10^5 /ml	x 10^5 /ml	/ mL	log
F86/01	0,00		5,14	28,53	0,16	1,80	9,16	0,54	257	1,76	36	0,24	0,108	0,061							1,05E+05	11,56
F86/1	1,00		5,14	28,53	0,18	2,02	11,52	0,68	264	1,81	46	0,31	0,152	0,230			1,05	0,00	1,05	0,00	0,00E+00	
F86/2	5,00		5,31	29,47	0,20	2,25	12,53	0,74	260	1,78	50	0,34	0,111	0,270			1,42	0,06	1,48	0,32	3,17E+04	10,36
F86/3	20,00		5,43	30,14	0,28	3,13	13,88	0,81	262	1,79	59	0,40	0,138	0,458			0,09	0,01	0,10	0,76	7,55E+04	11,23
F86/4	29,00		5,25	29,14	0,35	3,95	21,46	1,26	203	1,39	62	0,42	0,154	0,526			0,14	0,01	0,15	0,47	4,70E+04	10,76
F86/5	44,00		5,10	28,31	0,50	5,65	12,87	0,76	230	1,57	68	0,46	0,109	0,656			0,09	0,05	0,14	1,43	1,43E+05	11,87
F86/6	53,00		4,77	26,47	0,66	7,40	20,62	1,21	212	1,45	77	0,52	0,135	0,449			0,15	0,01	0,16	1,77	1,77E+05	12,08
F86/7	68,00		4,37	24,25	1,03	11,57	25,67	1,51	175	1,20	65	0,44	0,115	0,573			0,00	0,10	0,10	3,17	3,17E+05	12,67
F86/8	87,25		3,82	21,20	1,41	15,83	23,14	1,36	151	1,03	54	0,37	0,118	0,578			0,11	0,26	0,37	5,53	5,53E+05	13,22
F86/9	92,00		2,85	15,82	2,03	22,80	25,50	1,50	118	0,81	23	0,16	0,089	0,629			0,06	0,05	0,11	7,73	7,73E+05	13,56
F86/10	100,50		2,24	12,43	2,90	32,57	20,62	1,21	97	0,66	1	0,01	0,079	0,483			0,19	0,05	0,24	8,40	8,40E+05	13,64
F86/11	116,00		1,01	5,61	3,64	40,88	23,65	1,39	56	0,38	2	0,01	0,048	0,539			0,16	0,12	0,28	14,30	1,43E+06	14,17
F86/12	119,50	-7,50	5,59	31,02	0,05	0,56	7,81	0,46	283	1,94	17	0,12	0,071	0,001		0,00	0,07	0,09	0,16			
F86/13	123,50	-3,50	5,54	30,75	0,33	3,71	10,73	0,63	282	1,93	13	0,09	0,042	0,003		0,00	0,10	0,03	0,13	14,80	1,48E+06	14,21
F86/14	127,50	0,50	5,09	28,25	0,55	6,13	8,15	0,48	257	1,76	10	0,07	0,064	0,016		0,00	0,09	0,05	0,14	15,10	1,51E+06	14,23
F86/15	131,50	4,50	4,70	26,09	0,77	8,59	9,84	0,58	240	1,64	4	0,03	0,076	0,018		1,10	0,16	0,21	0,37	11,80	1,18E+06	13,98
F86/16	135,50	8,50	3,31	18,37	0,70	7,80	14,65	0,86	167	1,14	5	0,03	0,094	0,040		1,40	0,05	0,40	0,45	4,00	4,00E+05	12,90
F86/17	140,00	13,00	3,62	20,09	0,95	10,61			187	1,28	6	0,04		0,080		1,70	0,10	0,65	0,75	3,91	3,91E+05	12,88
F86/18	149,00	22,00	4,31	23,92	1,44	16,17			226	1,55	22	0,15	0,118	0,162		2,00	2,01	0,17	2,18	3,53	3,53E+05	12,77
F86/19	164,00	37,00	3,86	21,42	1,58	17,74			203	1,39	59	0,40	0,146	0,441		2,30	0,45	7,25	7,70		0,00E+00	
F86/20	174,00	47,00	3,93	21,81	1,70	19,09	29,63	1,74	204	1,40	79	0,54		0,402		2,60	0,10	12,50	12,60	0,06	5,89E+03	8,68

0,035 growth rate

Tabelle A6: Rohdaten der Fermentation F33:

	Fermentation F33	Standardfermentation / häufige Probenahme bei Virusvermehrung																						
	Zeit	Glucose	Glucose	Lactate	Lactate	Lactate/Glucose	Ammoniak	Ammoniak korrigiert	Ammoniak	Ammoniak korrigiert	Glutamine	Glutamine	Ammoniak/Gln	Gesamteiweiß	Osmolarität	HA (MW Dop	TCID50	Plaque	Zellzahl	Zellzahl/mL	ln Zellzahl	Zellzahlber	tote Zellen	ln Zellen
	h	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L		mg/l	mg/l	mmol/L	mmol/L	mg/L	µmol/L	*1000	g/L	mmol/kg	log units	Viren / mL	Viren / mL	x 10^5 / mL	/ mL		x 10^5 / mL	x 10^5 / mL	
33/01	0	4,93	27,36	0,167	1,88	0,07	9,44	10,9	0,554	0,642	239,00	1635,3	0,339		375				2,10	2,10E+05	12,25	2,10	0,00	
33/1	0,5	4,95	27,47	0,188	2,11	0,08	6,67	7,8	0,392	0,460	262,00	1792,7	0,218	6,54	379				2,00	2,00E+05	12,21	2,11	0,20	9,90
33/2	20,75	4,74	26,31	0,330	3,71	0,14	10,46	12,1	0,614	0,708	250,00	1710,6	0,359		382				0,55	5,50E+04	10,92	2,47	0,25	10,13
33/3	31,5	4,53	25,14	0,481	5,40	0,21	12,33	14,2	0,724	0,831	238,00	1628,5	0,445		390				0,20	2,00E+04	9,90	2,68	0,5	10,82
33/4	43,5	4,35	24,14	0,760	8,53	0,35	16,40	18,7	0,963	1,098	217,00	1484,8	0,649		389				2,20	2,20E+05	12,30	2,95	0,05	8,52
33/5	55,5	3,76	20,87	1,200	13,48	0,65	20,32	23,1	1,193	1,355	167,00	1142,7	1,044		390				0,66	6,60E+04	11,10	3,24	0,40	10,60
33/6	68,25	3,00	16,65	1,920	21,56	1,29	25,42	28,8	1,493	1,689	117,00	800,5	1,865		406				4,30	4,30E+05	12,97	3,58	0,35	10,46
33/7	79	2,08	11,54	2,760	30,99	2,68	28,39	32,1	1,667	1,884	77,00	526,9	3,164		406				8,20	8,20E+05	13,62	3,89	0,30	10,31
33/8	92,25	1,05	5,83	3,840	43,12	7,40	31,36	35,4	1,841	2,078	31,00	212,1	8,682	6,79	429				12,20	1,22E+06	14,01	4,31	0,16	9,68
33/02	95	6,03	33,47	0,016	0,18	0,01	8,08	9,4	0,474	0,553	258,00	1765,3	0,269	0,35	395	0			12,20	1,22E+06	14,01	12,20		
33/9	96,5	4,23	23,48	0,107	1,20	0,05	5,27	6,3	0,309	0,368	228,00	1560,0	0,198		365	0			11,95	1,20E+06	13,99	11,59		
33/10	97,5	4,38	24,31	0,171	1,92	0,08	4,93	5,9	0,289	0,346	230,00	1573,7	0,184		371	0						11,20		
33/11	98,5	4,38	24,31	0,265	2,98	0,12	5,86	6,9	0,344	0,407	226,00	1546,4	0,223		368	0						10,82		
33/12	99,5	4,15	23,03	0,383	4,30	0,19	6,63	7,8	0,389	0,457	223,00	1525,8	0,255		374	0						10,46		
33/13	100,5	3,95	21,92	0,473	5,31	0,24	7,23	8,5	0,425	0,497	221,00	1512,1	0,281		373	0			11,70	1,17E+06	13,97	10,11		
33/14	101,5	3,92	21,76	0,570	6,40	0,29	5,61	6,7	0,329	0,391	213,00	1457,4	0,226		378	0						9,77		
33/15	102,5	3,83	21,26	0,689	7,74	0,36	10,62	12,2	0,624	0,719	181,00	1238,5	0,504		377	0						9,44		
33/16	103,5	3,74	20,76	0,772	8,67	0,42	9,69	11,2	0,569	0,658	184,00	1259,0	0,452		392	0						9,12		
33/17	104,5	3,64	20,20	0,856	9,61	0,48	10,46	12,1	0,614	0,708	177,00	1211,1	0,507		378	0			11,60	1,16E+06	13,96	8,82		
33/18	105,5	3,42	18,98	0,889	9,98	0,53	13,43	15,4	0,789	0,903	149,00	1019,5	0,774		378	0						8,52		
33/19	106,5	3,41	18,93	0,985	11,06	0,58	12,41	14,2	0,729	0,836	152,00	1040,0	0,701		376	0						8,23		
33/20	107,5	3,29	18,26	1,050	11,79	0,65	10,12	11,7	0,594	0,686	159,00	1087,9	0,546		380	0						7,96		
33/21	108,5	3,20	17,76	1,120	12,58	0,71	10,12	11,7	0,594	0,686	165,00	1129,0	0,526		378	0			11,10	1,11E+06	13,92	7,69		
33/22	112,5	2,87	15,93	1,380	15,50	0,97	12,16	14,0	0,714	0,820	152,00	1040,0	0,687		382	1,2			11,3	1,13E+06	13,94	6,71		
33/23	116,5	2,69	14,93	1,610	18,08	1,21	12,58	14,4	0,739	0,847	132,00	903,2	0,818		383	1,5			10,9	1,09E+06	13,90	5,85		
33/24	120,5	2,44	13,54	1,720	19,32	1,43	14,28	16,3	0,839	0,959					401	1,8			10,38	1,04E+06	13,85	5,10		
33/25	124,5	2,34	12,99	1,870	21,00	1,62	15,90	18,1	0,934	1,065	134,00	916,9	1,018		397	2,1			9,55	9,55E+05	13,77	4,45		
33/26	128,5	2,25	12,49	1,960	22,01	1,76	17,60	20,0	1,033	1,176	127,00	869,0	1,189		395	1,5			9	9,00E+05	13,71	3,88		
33/27	132,5	2,13	11,82	2,020	22,68	1,92	16,92	19,3	0,994	1,132	125,00	855,3	1,162		395	1,8			7,6	7,60E+05	13,54	3,38		
33/28	136,5	1,99	11,04	2,030	22,80	2,06	18,62	21,2	1,093	1,243	118,00	807,4	1,354		392	2,4			6,5	6,50E+05	13,38	2,95		
33/29	140,5	1,99	11,04	2,090	23,47	2,13	18,53	21,1	1,088	1,237	112,00	766,3	1,420	0,05	399	2,455	7,94E+05		6,7	6,70E+05	13,42	2,57		
																				Zellwachstum	0,03062 growth rate			
spec. Yields cell growth:		0,006		-0,007				-0,001			0,000										-0,00126 death rate			
spec. Yields virus:		-0,091		0,103				0,014			-0,002													
																				Replikation	-0,01341 death rate			

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name:	Lars Möhler	
Adresse:	Große Wiese 6 38528 Rolfsbüttel 05373-920666	
Geburtsdatum:	10.03.1968	
Geburtsort:	Braunschweig	
Familienstand:	verpartnert	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	

Beruflicher Werdegang:

Schulische Laufbahn:	1974 – 78	Grundschule Meine
	1978 – 80	Orientierungsstufe Meine
	1980 – 87	Lessinggymnasium Wenden
	1987	Abitur am LG Wenden
Wehrdienst	1987 – 88	Grundwehrdienst, Bundeswehr
Studium	1988 – 95	Studium der Elektrotechnik an der Technischen Universität Braunschweig, Fachrichtung Nachrichtensysteme
Berufliche Tätigkeiten	1995 – 98	Lehrtätigkeit an der Handwerkskammer Braunschweig im Bereich Kommunikationselektronik und Elektroinstallation

1998	Technischer Verkäufer bei der Firma Siedle Telefon- und Telegrafenwerke
1998-99	Freiberufliche Lehrtätigkeit bei der VW-Coaching GmbH, der Handwerkskammer Braunschweig und dem Institut für Computer Technologie
Seit 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Magdeburg, 18.08.2006